

第8号

# 纖維研究所研究報告

2004

財団法人 衣笠会

京都市北区北野下白梅町29 〒603-8326

# 目次

## 報文

- クワ葉細胞への外来遺伝子の導入と発現  
大矢根未来・北島佐紀人・片山寿人・古澤壽治・杉村順夫 1
- コチニールの媒染によるキトサン処理柞蚕絹織物の染色性  
加古 武・山崎 隆 7
- 家蚕及び野蚕のセリシンの機能研究  
亀井加恵子・田中慶利・一田昌利・山崎 隆・三好 明 13
- RNA結合タンパク質の発現を抑制したカイコ細胞におけるCypovirus 1の感染  
小谷英治・林 幸之 21
- カイコの絹糸腺における  
ソルビトール-6-リン酸脱水素酵素およびトレハラーゼについて  
定金恵子・古澤壽治・林 幸之 27
- トランスジェニックカイコを用いた  
抗菌タンパク質遺伝子転写因子のノックダウン  
山本真史・山尾真史・森山悠子・松木浩之  
森 肇・林 幸之・田中博光・山川 稔 39
- 繊維集合体への透湿に対する数値シミュレーション 西村太良 51

## 短報

- 実習用簡易繰糸器の開発 一田昌利・小林崇子・黒田豊子 57

## 技術資料

- セリシン部タンパク質のカイコ品種間差異に関する研究 I  
一田昌利・三浦芳子・亀井加恵子・原 三郎・山崎 隆 61

- 財団法人 衣笠会繊維研究所活動状況 67

# クワ葉細胞への外来遺伝子の導入と発現

大矢根未来・北島佐紀人・片山寿人・古澤壽治\*・杉村順夫

## Expression of Foreign Genes Introduced to Mulberry Leaf Cells

Miki OHYANE, Sakihito KITAJIMA, Hisato KATAYAMA,  
Toshiharu FURUSAWA\* and Yukio SUGIMURA

Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology,  
Matsugasaki, Goshokaido-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

\*Center for Bioresource Field Science, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology,  
Saga-Ippongi-cho, Ukyo-ku, Kyoto 616-8354, Japan

### Abstract

Vital factors affecting the efficiency of gene delivery into mulberry leaf cells were investigated using a particle inflow gun. A chimeric plasmid DNA, pBI 221K-Hm, which contained  $\beta$ -glucuronidase (GUS) gene and hygromycin phosphotransferase (HPT) gene under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter was constructed and used in this experiments. Non-transformed tissues were significantly damaged by culturing onto 25-50  $\mu$ g/ml hygromycin-containing medium, by which transformed tissues could be selected efficiently. The bombardment efficiency which was evaluated by transient expression of GUS was remarkably increased by optimizing two factors examined; (1) shot distance between target tissues and microprojectiles, and (2) pre-culture periods of target tissues.

Key Words : Gene delivery, Mulberry, Bombardment,  $\beta$ -glucuronidase, Transient expression

### 1. まえがき

*Agrobacterium* を介してクワ組織およびクワカルス細胞に外来遺伝子を導入することが報告されている (Machii, 1990; Nozu *et al.*, 2000)。しかし、遺伝子導入された細胞からの個体再生が困難であり、未だ形質転換体は作出されていない。一方、外来遺伝子を金粒子に被覆し、クワ葉組織に高速度で打ち込んで外来遺伝子を導入することが可能である (Machii, 1996; Sugimura *et al.*, 1999b; 2000a)。また、クワカルスから得られたプロトプラストを用いて、electroporationにより遺伝子導入することも報告されている (Sugimura *et al.*, 1999c)。しかしながら、いずれも導入遺伝子の一過性発現が確認されているのみであり、ゲノムDNAに安定的に導入された形質転換クワの作

出に至っていない。クワ形質転換体を作成するためには、(1)細胞、組織からの個体再生系の確立、(2)効率的な遺伝子導入法の開発が必須条件となる。これまで、クワ葉組織からの高頻度個体再生系が確立されているので (Sugimura *et al.*, 1998; 1999b)、その個体再生系での遺伝子導入法の開発が望まれている。

本報告では、遺伝子銃 (particle gun, bombardment法) を用いて、個体再生が可能な葉組織への外来遺伝子の導入条件を検討した。外来遺伝子として、 $\beta$ -glucuronidase (GUS) 遺伝子と hygromycin phosphotransferase (HPT) 遺伝子を持つ最小ユニットの発現用プラスミドを構築した。GUS 遺伝子はレポーター遺伝子として、HPT 遺伝子は選抜マーカー遺伝子として機能するように設計された。

連絡先：京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科、606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所街道町、  
E-mail : sugimura@kit.ac.jp, TEL 075-724-7762

\*連絡先：京都工芸繊維大学繊維学部附属生物資源フィールド科学教育研究センター、  
616-8354 京都市右京区嵯峨一本木町1、E-mail : kpshi@kit.ac.jp, TEL 075-861-0714



## 2. 材料および方法

### 2.1 供試植物の育成

低温保存されていたクワ (*Morus alba* cv. 'Shin-ichinose') 種子を70%エタノールに30秒間浸した後、1%次亜塩素酸ナトリウム液中で20分間表面殺菌した。滅菌水で十分に洗浄後、実生苗育成培地に播種し、人工気象器 (27°C、連続照射条件) で無菌育成した。実生苗育成培地は、前報に準じて調製した (Sugimura *et al.*, 1998; 1999b)。すなわち、LS基本培地 (Linsmaier and Skoog, 1965) に、植物成長調整物質であるサイトカニン剤として $10^{-5}$ M 6-ベンジルアデニン (6-BA)、抗オーキシシンとして $10^{-7}$ M 2,3,5-トリヨード安息香酸 (TIBA) を添加して調製した。

### 2.2 供試葉組織の調製と培養

ハイグロマイシンに対する葉組織の感受性を調べる実験では、育成した実生苗から本葉の展開葉を無菌的に取り出し、ハイグロマイシン (Hm) 添加培地に置床し、人工気象器 (27°C、12時間照明条件) で3週間培養した。Hm添加培地は、LS基本培地組成にサイトカニン剤として $10^{-5}$ M チジアゾール (TDZ) と $10^{-7}$ M TIBAを添加し、さらに、種々の濃度のHmを加えて調製した。

遺伝子銃を用いた実験では、育成した実生苗から本葉を摘出し、不定芽形成培地に置床し、人工気象器 (27°C、12時間照明条件) で0~5日間前培養した。不定芽形成培地には、LS基本培地組成に加え、 $10^{-5}$ M TDZと $10^{-7}$ M TIBAが添加されていた。

### 2.3 発現用ベクターの作成

供試したpBI 221 (Clontech Lab. USA) のプラスミド構成を図1に示す。このプラスミドに挿入されているNos-terminatorのEcoR IサイトをKpn Iサイトに置換し、pBI 221Kを作成した。また、pTL7IG221-130Hm (日本製紙から分譲) をKpn Iで切断して、このプラスミドに含まれる [CaMMV 35S-promoter/HPT遺伝子/CaMMV 35S-terminator] カセットを分離した後、pBI 221KのKpn Iサイトに挿入し、pBI 221K-Hmプラスミド

を構築した。従って、この発現用プラスミドベクターは、CaMMV 35Sプロモーターの下流にGUS遺伝子およびHPT遺伝子が存在する最少ユニットのベクターである (図1)。

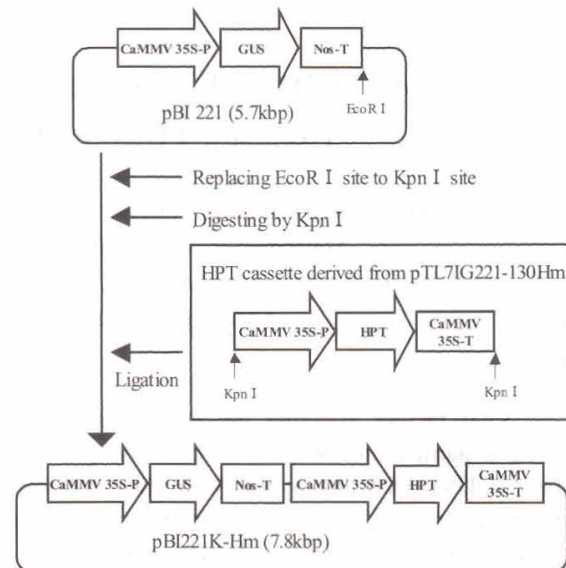


Fig.1. Schematic flow for construction of pBI221K-Hm

### 2.4 遺伝子銃による撃ち込みと一過性発現の検出

用いた遺伝子導入装置 (GIE-III, IDERA, 田中製) は、inflow型遺伝子銃であり、遺伝子を被覆した金粒子に直接ヘリウムガスを吹き付けて発射させる方式である。チャンバー内圧力、ヘリウムガス噴出時間、ヘリウムガス噴出圧力、噴出口から標的組織までの試料間距離が可変できる。本実験では、前報に準じて (Sugimura *et al.*, 1999a; 2000)、チャンバー内圧力を600mmHg、ヘリウムガス噴出時間を0.025秒、ヘリウムガス噴出圧力を $6\text{kgf/cm}^2$ に設定し、試料間距離を可変させて遺伝子導入効率が高くなる最適条件を検討した。

金粒子 ( $1.0\ \mu\text{m}$ 直径) へのDNA被覆は、 $50\ \mu\text{l}$ 金粒子懸濁液 ( $60\text{mg}$ 金粒子/ml) に $10\ \mu\text{l}$ プラスミドDNA ( $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ )、 $50\ \mu\text{l}$ 塩化カルシウム ( $2.5\ \text{M}$ )、 $20\ \mu\text{l}$ スベルミジン ( $0.1\ \text{M}$ ) を順次加えて、室温で30分間放置した。低速遠心で金粒子を回収し、70%エタノールで洗浄後、100%アルコールを $50\ \mu\text{l}$ 加えて、プラスミドDNA被覆金粒子懸濁液を調製した。この $5\ \mu\text{l}$ 懸濁液を1回に撃ち込む量

Table 1. Leaf tissue responses induced by hygromycin

Hm conc. ( $\mu$ g/ml)	Induction (%)			
	Adventitious bud	Browning	Chlorosis	No response
0	94.5	0	0	5.5
12.5	5.6	88.8	2.8	2.8
25	0	77.8	22.2	0
50	0	22.2	77.8	0

とした。

プラスミドDNA被覆金粒子が撃ち込まれた葉組織は、前述の不定芽形成培地に置床した。2日間培養した後、50mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) を含む 1 mM X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronic acid) に浸し、真空浸透した。37℃、6時間以上反応させた後、70%エタノールで反応を停止させて脱色した。X-glucはGUSの人工基質であり、GUS遺伝子が一過性発現した細胞では、青色の不溶性インジゴチンが生成されるので、顕微鏡下でその青色スポット数をカウントした。

### 3. 実験結果

#### 3. 1 選抜用ハイグロマイシンの最適濃度の検討

作成したpBI221K-Hmプラスミドは、選抜マーカー遺伝子としてHPT遺伝子が挿入されており、形質転換細胞ではHmに対して耐性となるが、非形質転換細胞では致死する。Hmの最適濃度を設定することにより、Hm耐性形質転換細胞の効率的な選抜が期待される。

非形質転換細胞がHm添加により生育不全、機能不全、致死に至る濃度を検討した。不定芽形成培地に種々のHm濃度を添加して、外植片の変化を観察した (表1、図2)。その結果、無添加培地 (対照) では、葉底部から高頻度で不定芽の形成が観察された。一方、Hm添加濃度が高くなるに従い、葉組織の肥大生長が抑えられ、12.5  $\mu$ g/mlでは不定芽形成が起こるが、その頻度は低く、緑色が退色し、局部的に褐変斑が出現した。さらに、25  $\mu$ g/mlでは、葉組織の肥大生長が完全に抑制され、褐変と白化が著しかった。50  $\mu$ g/mlでは、機能不全が著しく葉組織の白化率が高くなっ

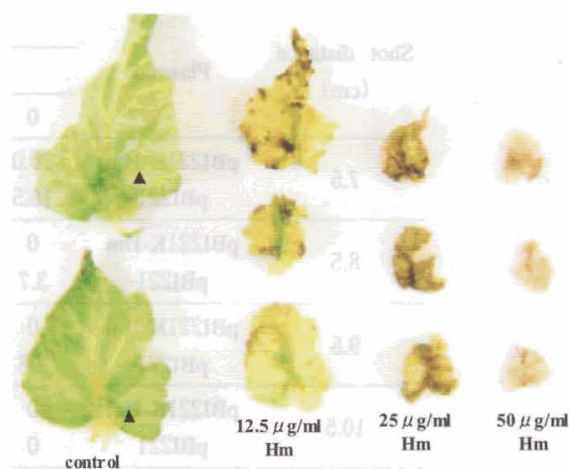


Fig.2. Leaf appearance induced in hygromycin-containing medium. Arrow heads: adventitious shoot buds.

た。なお、Hmは葉緑体でのタンパク合成機能を抑制するため、葉組織の白化症状が誘導されると考えられる。

非形質転換細胞をHmにより機能低下や致死させ、形質転換細胞ではHPT遺伝子の発現に伴いHm活性を不活化して形質転換細胞のみを生存させることである。高濃度のHm添加は、非形質転換細胞を致死させることには有効である。しかし、形質転換細胞でのHPT遺伝子の発現量が少ない場合、組織に取り込まれたHmの不活化が不十分となり、形質転換細胞でも機能不全に陥る事態が想定される。このことを考慮して、選抜用Hm濃度は25~50  $\mu$ g/mlが適していると考えられる。

#### 3. 2 金粒子の撃ち込み衝撃による不定芽形成への影響

金粒子を担体として、高速で遺伝子を撃ち込むため、標的となる外植片組織に強い物理的衝撃が加わる。その衝撃により、外植片組織からの不定芽誘導が妨げられることが懸念される。金粒子の



Table 2. Effect of bombardment shot on adventitious bud formation

Shot distance (cm)	Adventitious bud (%)	No response (%)
control	94.1	5.9
6.5	87.9	12.1
7.5	93.2	6.8
8.5	94.6	5.4
9.5	94.6	5.4

Table 3. Transient expression of GUS in different conditions

Shot distance (cm)	Plasmid	No. of blue spots/cm <sup>2</sup>					
		Pre-incubation period (days)					
		0	1	2	3	4	5
7.5	pBI221K-Hm	20.0	25.3	29.6	132.2	44.4	29.3
	pBI221	16.5	25.3	60.2	196.7	28.2	17.1
8.5	pBI221K-Hm	0	3.7	5.0	35.2	4.8	10.9
	pBI221	3.7	6.7	15.3	16.9	6.3	9.6
9.5	pBI221K-Hm	0	0	2.5	4.8	2.8	0
	pBI221	2.8	0	4.7	8.8	0	3.4
10.5	pBI221K-Hm	0	0	0	0	0	0
	pBI221	0	0	0	4.1	0	0

噴射口から標的組織までの試料間距離を可変させ、衝撃力が不定芽形成に及ぼす影響を調べた(表2)。その結果、試料間距離を6.5cmに設定すると、不定芽形成率が若干低下する傾向があり、7.5cm以上の距離を保つことが必要であると考えられた。従って以下の実験では、試料間距離を7.5cm~10.5cmの条件で検討することとした。

### 3. 3 発現ベクターの導入条件と一過性発現

遺伝子銃で外来遺伝子を導入する場合、物理的要因と生物学的要因が関係する。物理的要因として、遺伝子担体である金粒子の加速速度、標的組織表面での衝撃・貫通力に関わるパラメーターである。本実験では、試料間距離のみを7.5cm~10.5cmに可変し、金粒子が組織内に着地させる条件を検討した。一方、生物学的パラメーターとして、遺伝子を導入する標的葉組織の生理的状態、葉組織が持つ金粒子の貫通抵抗強度が考えられ、これら因子が遺伝子導入効率を支配すると想定される。前培養により葉組織の生理的および物理的状態を変化させ、遺伝子導入効率に及ぼす影響を調べた。すなわち、標的葉組織の前培養期間(0



Fig.3. Transient expression of GUS in bombarded leaf tissues.

~5日間)の最適化を図った。また、発現ベクターとして、pBI 221とpBI 221K-Hmを用いて、両者間のプラスミド構成の差異についても調査した(表3、図3)。

噴射口から標的組織までの試料間距離を9.5cmまたは10.5cmに設定したとき、GUS遺伝子の発現

を示す青色スポット数は、前培養期間や供試したベクターにかかわらず、平均10スポット未満/cm<sup>2</sup>組織であった。一方、試料間距離を7.5cmに設定し、3日間前培養した葉組織を用いたとき、供試した両ベクターとも青色スポット数が飛躍的に増加した。すなわち、この条件下において、両発現ベクターとも標的葉細胞の核内に着地・導入される頻度が高く、レポーター遺伝子であるGUS遺伝子からGUS酵素への一過性発現が起っていることを示している。なお、両発現ベクター間には、遺伝子導入効率に有意な差異はなく、HPT遺伝子の付加による影響はないと考えられる。

#### 4. 考察

遺伝子銃により、外来遺伝子を導入する発現ベクターとして望まれる条件は、(1)高発現プロモーターが搭載されていること、(2)効率良く形質転換体が選抜できる適切な選抜マーカーが搭載されていること、(3)レポーター遺伝子が搭載されており、容易にその発現が識別できることである。本研究では、これまで一過性発現用ベクターとして広く用いられていたpBI 221に選抜マーカー遺伝子であるHPT遺伝子を挿入したpBI 221K-Hmを作成した。この発現用ベクターは、高発現のCaMV-35Sプロモーター制御下に、HPT遺伝子とGUS遺伝子が搭載されており、必要最少ユニットの発現用ベクターである。これまで、選抜マーカー遺伝子として、neomycin phosphotransferase (NPT II) 遺伝子が利用されていた。しかし、クワ葉組織はカナマイシンに対する感受性が低く、高濃度のカナマイシンでも非形質転換細胞が生存できるため、NPT II 遺伝子による選抜効率が低かった。本実験から、25  $\mu$ g~50  $\mu$ g/mlのHm添加により、非形質転換細胞を機能不全させることが可能となり、HPT遺伝子による選抜効率が飛躍的に高まるものと期待される。

物理的パラメーターの1因子である噴射口から標的組織までの試料間距離と標的葉組織の前培養期間を最適化することにより、GUS遺伝子の一過性発現が起こっている細胞群が多数検出された。このことは、遺伝子銃により再生可能なクワ葉組

織にGUS遺伝子が導入されたことを意味している。この一過性発現細胞群から、安定的にクワゲノムDNAにGUS遺伝子およびHPT遺伝子が組み込まれた形質転換細胞が選抜できると考えられる。従って本研究により、遺伝子銃によるクワ形質転換体の作出条件の基盤が確立できたと結論できる。

クワ形質転換実験系の基盤開発により、医薬品などの高付加価値タンパク質の遺伝子を導入した形質転換クワの作出が可能となり、「カイコ飼育用のクワ栽培」から「有用物質を生産するクワ栽培」に転換できると考えられる(杉村ら, 2000)。このバイオ技術を実用化させるためには、解決されなければならないハードルが残されてはいるものの、桑園経営の新たなビジネスチャンスを引き出す技術と期待される。

#### 5. 摘要

Inflow型遺伝子銃を用いて、クワ葉細胞への外来遺伝子の導入に関わる因子について検討した。用いたプラスミドはCaMMV 35Sプロモーターの下流に $\beta$ -glucuronidase (GUS) 遺伝子とhygromycin phosphotransferase (HPT) 遺伝子を持つ最少単位の発現ベクターであった。非形質転換のクワ葉組織は、25~50  $\mu$ g/mlのハイグロマイシンで機能不全になることから、この濃度域で形質転換細胞を効率良く選抜できると考えられる。また、(1) 遺伝子の噴射口と試料間の距離、(2) 標的葉組織の前培養期間を最適化することにより、GUS活性の一過性発現細胞数が顕著に増加し、遺伝子導入効率が向上することを明らかにした。

#### 引用文献

- Linsmaier, E.M., and Skoog, F., (1965) : Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 18, 100-127.
- Machii, H. (1990) : Leaf disk transformation of mulberry plant (*Morus alba* L.) by *Agrobacterium* Ti plasmid. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 59, 105-110.
- Machii, H., Sung, G-B., Yamanouchi, H. and

- Koyama, A. (1996) : Transient expression of GUS gene introduced into mulberry plant by particle bombardment. J. Seric. Sci. Jpn., 65, 503-506.
- Nozu, M., Cai, W., Li, L., Xu, W., Shioiri, H., Kojima, M. and Saito, H. (2000) : Development of a reliable method for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of mulberry callus. J. Seric. Sci. Jpn., 69, 345-352.
- Sugimura, Y., Adachi, T., kotani, E. and Furusawa, T. (1998) : Shoot bud formation and plantlet regeneration from the basal tissues of mulberry leaves. J. Seric. Sci. Jpn., 65, 421-425.
- Sugimura, Y., Adachi, T., Ueda, Y., Abe, M., Kotani, E. and Furusawa, T. (1999a) : Transient expression of  $\beta$ -glucuronidase gene transferred into leaf tissues of mulberry seedling by the particle inflow gun. Sericologia, 39, 33-38.
- Sugimura, Y., Adachi, T., Kotani, E. and Furusawa, T. (1999b) : Efficient induction of shoot organogenesis from leaves of mulberry seedling using 2,3,5-triiodobenzoic acid. Plant Biotech., 16, 123-127.
- Sugimura, Y., Miyazaki, J., Yonebayashi, K., Kotani, E. and Furusawa, T. (1999c) : Gene transfer by electroporation into protoplasts isolated from mulberry calli. J. Seric. Sci. Jpn., 68, 49-53.
- Sugimura, Y., Uchida, A., Adachi, T., Hasegawa, H., Kotani, E. and Furusawa, T. (2000) : Major improvements in gene delivery into mulberry leaf cells by particle inflow gun. J. Seric. Sci. Jpn., 69, 39-45.
- 杉村順夫・小谷英治・古澤壽治 (2000) : クワを用いた分子農業の基礎的研究. 科学研究費補助金基盤研究(B), 研究成果報告書. p.51



# コチニールの媒染によるキトサン処理柞蚕絹織物の 染色性

加古 武・山崎 隆

## Dyeing Properties of Chitosan-Treated Tussah Silk Fabric dyed with Cochineal by Mordant dyeing

Takeshi KAKO and Takashi YAMAZAKI

*Kinugasa Textile Research Institute, The Kinugasa-kai Foundation,  
29 Kitano Shimo-Hakubai-cho, Kita-ku, Kyoto, 603-8326, Japan*

### Abstract

The dyeing affinity (K/S value) of chitosan-treated tussah silk fabrics (chitosan-treated fabrics) dyed with cochineal was higher than that of untreated tussah silk fabrics (untreated fabrics), and the dyeing affinity of these unmordanted and mordanted fabrics increased in the order of unmordanted < Cu-mordanted, Sn-mordanted < Fe-mordanted, Al-mordanted. The hue of dyed fabrics was light Purple, Red, Red purple, Purple and Black, on unmordanted, Sn-mordanted, Al-mordanted, Cu-mordanted and Fe-mordanted fabrics, respectively. By chitosan treatment, the hue was rarely changed in every mordanting, except in Al-mordanting. The brightness decreased in all mordanting. And the chroma tended to be higher in Al-mordanting and lower in Cu-mordanting and Fe-mordanting. The wet rubbing fastness of untreated fabrics and chitosan-treated fabrics were low in all mordanting, But the fastness was appreciably increased after soaping, and it was considerably increased by treating with cationic surface active agent or formaldehyde. The effect of chitosan treatment was very little observed. The light fastness was generally high and tended to be higher in Cu-mordanting and Fe-mordanting than in Sn-mordanting and Al-mordanting. Chitosan treatment increased the fastness in unmordanted fabrics, but decreased it in Sn-mordanted and Al-mordanted fabrics.

**Key Words :** Tussah silk, Chitosan treatment, Cochineal, Mordant dyeing, Dyeing Property

## 1. まえがき

近年、自然志向や個性化、多様化などから地球にやさしい繊維として絹が再評価されている。

多くの繊維のうち絹製品は、人々があこがれている繊維で、野蚕絹のうち柞蚕絹は最も多く生産され、家蚕絹に比べて強靱性、耐摩耗性、耐薬品性、強い光沢性、特有な風合い、また生分解性もあり、ニット製品、混紡製品などに用いられているが、染色性が低いといわれている。

前報では、直接染料を用いてキトサン処理柞蚕

絹を染色すると、染着性が増加することを報告した[1]。

コチニールは、サボテンに寄生するメキシコ原産の貝殻虫(雌)で、主色素がカルミン酸(グルコピラノシル基をもつアントラキノン誘導体、C-配糖体)であり、絹や羊毛などに親和性があるといわれ、古くから利用されてきた。また、近頃の天然志向から草木染めが望まれていて、そのうちの数少ない動物染料で、安価であり染料が多く含まれていることなどからコチニールが多く用いられている。一般に媒染剤による絹の染色について

も多くの報告がある[2]。

そこで、今回、直接染料（水素結合などの増加）と染色機構などが異なるコチニールを用いて、柞蚕絹の染着濃度および染色堅ろう度を高めるため、先媒染（金属塩）したキトサン処理柞蚕絹織物の染色性について検討した。

## 2. 材料と方法

使用した試料、精練、キトサン処理、媒染処理、染色、染着濃度、色の三属性、色差および染色堅ろう度の測定方法などを下記に示した。

### 2. 1 試料

前報[1]と同じ柞蚕絹織物（ボンジー）を用いた。

### 2. 2 精練

前報[1]と同じセッケン・アルカリ法による。以下、これを無処理織物とする。

### 2. 3 キトサン処理

前報[1]と同じ2dip-2nip法による。以下、これを0.75%キトサン処理織物とする。

### 2. 4 先媒染処理

(1) スズ酸ナトリウム 5 g/lとクエン酸15g/lを混合、(2) 酢酸アルミニウム 5 g/l、(3) 酢酸銅 5 g/l、(4) 木酢酸鉄50ml/lの各金属イオン溶液（浴比 1 : 120）に試料を浸漬し、いずれも 20 ± 2 °C、60分間、媒染処理後、絞った。

### 2. 5 染色

コチニール（乾燥）20gをできるだけ細かくすり潰した後、水を加えて煎じた後ろ過し、染浴11とした。80°C、60分間、浴比 1 : 120で染色し、十分水洗、自然乾燥した。

### 2. 6 後処理

(1) マルセル石鹼 5 g/l、40°C、20分間、浴比 1 : 120でソーピングし、水洗後、自然乾燥した。(2) ソーピング後、カチオン活性剤 4 ml/l、酢

酸 (99.7%) 5 ml/lで、20°C、30分間、浴比1:120で処理し、十分水洗後、自然乾燥した。(3) ソーピング後、ホルマリン (40%) 2 %、酢酸 (99.7%) 1 %、60°C、20分間、浴比 1 : 120で処理し、十分水洗後、自然乾燥した。

### 2. 7 染着濃度

島津製ダブルビーム型分光光度計210-A型を用いた。染着濃度 (K/S) は表面染着濃度で示し、Kubelka-Munk式により算出した[3]。

### 2. 8 色の三属性

日本電色製カラーメーター ZE-2000を用い、色の三属性を測定した。

### 2. 9 色差

1976CIE (L\*a\*b\*) 表色系により  $\Delta(E^*ab)$  を算出した。

### 2. 10 染色堅ろう度

JIS L規格に準じた。

- (1) 摩擦堅ろう度はJIS L 0849-1996、摩擦試験機Ⅱ型を用いた。
- (2) 水堅ろう度はJIS L 0846-1996に準じた。
- (3) 洗濯堅ろう度はJIS L 0844-1997 A-1に準じた。
- (4) 汗堅ろう度はJIS L 0848-1996に準じた。
- (5) ドライクリーニング堅ろう度はJIS L 0860-1996に準じた。
- (6) ホットプレッシング堅ろう度はJIS L 0850-1994に準じた (200°C、15秒)。
- (7) 日光堅ろう度はJIS L 0841-1998に準じた (直射日光法、20時間露光)。

## 3. 結果と考察

### 3. 1 染着性

コチニールの金属媒染による無処理織物、キトサン処理織物の染着性をTable 1に示した。

無処理織物、キトサン処理織物の染着濃度はいずれも無媒染では低いが、後者が前者より1.9倍高かった。しかし金属イオン媒染によって、染着

Table 1 Dyedding affinity, tristimulus values, three attributes of color and color difference of untreated and chitosan-treated tussah silk fabrics dyed with cochineal

Mordant	Chitosan Add-on (%)	K/S				X	Y	Z	L*	a*	b*	∠E*ab
		value	Rate	(value)*								
Non	0	2.1	1	1	(0.8)	22.40	19.42	21.79	51.17	16.11	2.00	0.0
	0.75	3.9		1.9	(1.1)	12.94	11.21	12.60	39.93	13.48	1.61	11.6
Sn	0	9.8	4.7	1	(4.8)	21.28	13.03	7.07	42.81	46.99	23.17	0
	0.75	11.8		1.2	(7.8)	19.89	11.89	5.67	41.03	47.92	25.66	3.2
Al	0	12.4	5.9	1	(11.8)	10.23	6.56	6.66	30.77	33.75	3.98	0
	0.75	15.1		1.2	(13.7)	9.86	6.27	5.59	30.07	33.93	7.12	3.2
Cu	0	8.0	3.8	1	(6.7)	7.59	5.92	8.53	29.21	18.23	-5.32	0
	0.75	10.7		1.3	(8.0)	6.03	4.72	6.55	25.93	16.63	-3.93	3.9
Fe	0	12.0	5.7	1	(10.2)	3.66	3.46	5.18	21.82	4.09	-5.30	0
	0.75	12.5		1.04	(10.4)	3.55	3.37	5.02	18.37	2.31	-3.34	0.5

\* (value) : soaping after dyeing

濃度は無処理織物では無媒染の3.8~5.7倍、キトサン処理織物では無媒染の2.9~3.9倍高くなり、キトサン処理織物の染着濃度が無処理織物より高かった。また金属イオン媒染後のコチニールによる無処理織物、キトサン処理織物の染着濃度は、いずれも無媒染<銅媒染・スズ媒染<鉄媒染・アルミニウム媒染の順に高くなった。

以上のように染着濃度は、キトサン処理によって媒染および染着の効果を高め、著しく増加した。これは、前述の実験方法では染着機構を述べることはできないが、染色条件などからキトサン処理によって配位結合のほか、イオン結合、水素結合などの増加が考えられる。

### 3. 2 色の三属性

コチニールの金属媒染による無処理織物、キトサン処理織物の色の三属性、色素をTable 1に示した。

色の三属性のうち色相については、無媒染では薄紫色であったが、媒染処理では、コチニールのカルミン酸(色素分子)が金属イオンを介して柞蚕絹フィブロイン分子、またはキトサン分子と結合して、色調が深色側に変化して安定化し、スズ媒染-赤色、アルミニウム媒染-赤紫色、銅媒染-濃紫色、鉄媒染-黒色になった。また、キトサン処理によって、アルミニウム媒染はやや黄味の赤

紫色に変化したが、その他はほとんど変化がみられなかった。明度については、キトサン処理によっていずれも低下した。これは染着濃度が高くなるためと考えられる。彩度については、スズ媒染、アルミニウム媒染は高くなるが、無媒染、銅媒染、鉄媒染は低くなる傾向がみられた。これらは配位子の種類や立体配座などにより媒染した柞蚕絹中の金属イオンと色素分子との錯塩が生じて発色し[4]、アルミニウムイオンは典型金属イオン(6配位)の外軌道型錯体であるため、鉄イオンなどのような遷移金属イオンの内軌道型錯体より弱いが、媒染による色相の変化が小さく、色調の鮮明度も優れていること[5]、また、鉄イオンなどのような重金属イオンほど、暗い色を出すこと[6]などによるものと考えられる。

色差(∠E\*ab)については、キトサン処理によって無媒染は11.6と著しく大きくなり、媒染処理は0.5~3.9と比較的小さい傾向がみられた。これらは、無媒染では、明度、色相、彩度のうち明度が著しく変化し、染着濃度がかなり増加したためと考えられる。また、一方、媒染処理では色差(∠E\*ab)が小さいのは、キトサン処理による色相、彩度による若干の影響もあるが、明度差も小さく、染着濃度差も無媒染ほど大きな差はみられないためと考えられる。



Table 2 Color fastness to rubbing of untreated and chitosan-treated tussah silk fabrics dyed with cochineal

Mordant	Chitosan Add-on (%)	K/S Value	Rubbing							
			Non-sorping		Sorping		Soaping, Cationic agent		Soaping, Formarine	
			Dry	Wet	Dry	Wet	Dry	Wet	Dry	Wet
Non	0	2.1 ( 0.8)	4	2	5	4-5	5	5	5	4-5
	0.75	3.9 ( 1.1)	3-4	2	5	4-5	5	5	5	4-5
Sn	0	9.8 ( 4.8)	3	2	4-5	4-5	5	4-5	5	4-5
	0.75	11.8 ( 7.8)	3-4	2	4	3-4	5	4-5	5	4-5
Al	0	12.4 (11.8)	3-4	2	3-4	2-3	5	3-4	5	4-5
	0.75	15.1 (13.7)	3	2	3-4	3	5	3-4	5	4-5
Cu	0	8.0 ( 6.7)	4	2	4-5	2-3	5	4	5	4
	0.75	10.7 ( 8.0)	3-4	2	4-5	3	5	4	5	4
Fe	0	12.0 (10.2)	3	3	4-5	4	5	3-4	5	4
	0.75	12.5 (10.4)	3	2-3	4-5	4	5	3-4	5	4

K/S value ( ) : treated with maruseil soap 5g/l at 40°C for 20 min after dyeing.

Table 3 Color fastness to water, washing and light of untreated and chitosan-treated tussah silk fabrics dyed with cochineal

Mordant	Chitosan Add-on (%)	K/S Value	Water			Washing			Light $\Delta E^*ab$
			Staining		Change in color	Staining		Change in color	
			C	S		C	S		
Non	0	2.1 ( 0.8)	4-5	4-5	3	5	5	1-2	2.4
	0.75	3.9 ( 1.1)	5	4-5	2-3	5	5	1-2	0.9
Sn	0	9.8 ( 4.8)	3	5	3	5	5	3	1.8
	0.75	11.8 ( 7.8)	5	3-4	5	5	4	3	2.2
Al	0	12.4 (11.8)	5	4	5	5	5	4-5	1.4
	0.75	15.1 (13.7)	5	4-5	5	5	4-5	4-5	3.4
Cu	0	8.0 ( 6.7)	4-5	5	5	5	4-5	3-4	1.4
	0.75	10.7 ( 8.0)	4-5	5	5	5	4-5	4	1.5
Fe	0	12.0 (10.2)	5	4	5	5	4	4	0.9
	0.75	12.5 (10.4)	5	4-5	5	5	4	4	0.7

K/S value ( ) : treated with maruseil soap 5g/l at 40°C for 20 min after dyeing. C : cotton. S : silk

### 3. 3 染色堅ろう度

コチニールの金属媒染による無処理織物、キトサン処理織物の染色堅ろう度をTable 2~4に示した。

摩擦堅ろう度についてはTable 2に示すように、湿潤堅ろう度は乾燥堅ろう度よりかなり低いが、ソーピングによって、いずれも堅ろう度が高くなった。さらに、ソーピング後カチオン活性剤溶液、

またはホルマリン溶液で処理すると、乾燥堅ろう度は5級となり、湿潤堅ろう度は3-4~5級と高くなった。Table 3に示すように、水堅ろう度および洗濯堅ろう度の変退色は、前者は無媒染2-3級、後者は無媒染1-2級と著しく低いが、媒染処理によって堅ろう度は増大した。日光堅ろう度は、日光露光前後(20時間)の色差( $\Delta E^*ab$ )がいずれも小さく良好であった。銅媒染、鉄媒染

Table 4 Color fastness to dry cleaning and perspiration of untreated and chitosan-treated tussah silk fabrics dyed with cochineal

Mordant	Chitosan Add-on (wt%)	K/S Value	Dry cleaning			Perspiration					
			Staining		Change in color	Acidic			Alkaline		
			C	S		Staining		Change in color	Staining		Change in color
					C	S	C		S	C	
Non	0	2.1	5	5	3	4-5	4-5	2-3	4-5	4-5	3
	0.75	3.9	5	5	3	4-5	4-5	2-3	4-5	4-5	3
Sn	0	9.8	5	5	3-4	3-4	3	4-5	3	4	3-4
	0.75	11.8	5	5	4	4	3-4	4-5	3	3	3
Al	0	12.4	5	5	4-5	4	3-4	4-5	4-5	3-4	4-5
	0.75	15.1	5	5	4	4-5	1	4-5	4	3-4	4-5
Cu	0	8.0	5	5	4	3-4	4	4	3	4	3-4
	0.75	10.7	5	5	4	4	4-5	4-5	3	4-5	3-4
Fe	0	12.0	5	5	4	5	3-4	5	3-4	3-4	5
	0.75	12.5	5	5	4-5	5	3-4	5	3-4	3-4	5

による堅ろう度は、無媒染、スズ媒染、アルミニウム媒染より高かった。これらについてはコチニールが日光に強いといわれていること[6]、染色布の染着濃度が高いこと、色素母体の発色団と金属イオンと結合によって安定化すること、また、媒染の配位結合能が大きく、その強さは鉄がアルミニウムより大きく、配位結合、イオン結合が堅ろう度に影響したものと考えられる[7]。一般にキトサン処理は耐光堅ろう度が高くなるといわれているが、コチニールの日光堅ろう度は、キトサン処理によって無媒染では高くなるが、媒染処理ではいずれも若干低くなる傾向を示した。これは媒染処理がキトサン処理より堅ろう度に対する影響が大きいものと考えられる。Table 4に示すように、ドライクリーニング堅ろう度では、汚染は5級と堅ろうであるが、変退色の無媒染が3級とやや低い媒染処理によってかなり高くなった。汗堅ろう度では、一般に酸性人工汗液処理はアルカリ性人工汗液処理より若干高かった。酸性人工汗液処理では、キトサン処理によって向上する傾向がみられた。無媒染では変退色の酸性人工汗液2-3級、アルカリ性人工汗液3級と低い媒染処理によって高くなった。ホットプレッシング堅ろう度は、200℃、15秒間処理した場合、いずれも5級と高かった。

#### 4. 摘要

コチニールを用いて、金属塩媒染後のキトサン処理柞蚕絹の染色性について検討した。

無処理織物、キトサン処理織物の染着濃度(K/S値)は、無媒染では低いが、媒染処理によって著しく高くなった。また、キトサン処理によって、無媒染、媒染処理、いずれも染着濃度が高くなり、無媒染<銅媒染・スズ媒染<鉄媒染・アルミニウム媒染の順に高くなる傾向がみられた。色相は、無媒染では薄紫色であったが、媒染処理では、スズ媒染-赤色、アルミニウム媒染-赤紫色、銅媒染-紫色、鉄媒染-黒色を示した。キトサン処理によって色相はほとんど変化がみられないが、アルミニウム媒染はやや黄味の赤紫色になった。また、明度はいずれも低下した。彩度はスズ媒染、アルミニウム媒染が高くなり、無媒染、銅媒染、鉄媒染が低い傾向を示した。色差( $\Delta E^*_{ab}$ )は、キトサン処理によって無媒染は著しく大きくなり、媒染処理では比較的小さかった。

摩擦染色堅ろう度については、湿潤が乾燥よりかなり低かった。ソーピングによって堅ろう度が高くなるが、湿潤は低かった。ソーピング後カチオン活性剤処理、またはホルマリン処理によって乾燥、湿潤ともに堅ろう度がさらに高くなった。

汗堅ろう度では、酸性人工汗液処理はアルカリ性人工汗液処理より若干高くなり、酸性人工汗液処理では、堅ろう度がキトサン処理によって向上した。日光堅ろう度は、いずれも日光露光前後の色差は小さく堅ろう度であったが、キトサン処理によって無媒染は高くなるが、媒染処理は低くなる傾向がみられた。

## 文献

- [1] 加古 武 (2001)：直接染料によるキトサン処理柞蚕絹織物の染色性、日蚕雑、70 (2)、117-122
- [2] 皆川 基・原山智子・谷先りさ・山下千代 (1993)：コチニール色素による絹の染色に関する研究、大阪市立大学生活科学学部紀要、41、27-34
- [3] 寺主一成 (1983)：色材色彩工学、pp.127、色染社、大阪
- [4] 中原勝儼 (2000)：色の科学(改訂版)、pp.130-160、培風館、東京
- [5] 木村光雄 (1987)：天然染料の特殊性と歴史的展開、染色工業、35 (1)、1-17
- [6] 青柳太陽 (1994)：工芸のための染料の科学、pp.4・1-4・14、理工学社、東京
- [7] 中川弑郎・衣笠順三 (1987)：草木染の商品開発、染色工業、35 (1)、18-21



# 家蚕及び野蚕のセリシンの機能研究

亀井加恵子\*・田中慶利\*・一田昌利\*\*・山崎 隆\*\*\*・三好 明\*\*\*\*

## Functions of Silk Sericin of Domestic and Wild Silkmoths

Kaeko KAMEI\*, Nobutoshi TANAKA\*, Masatoshi ICHIDA\*\*,  
Takashi YAMAZAKI\*\*\* and Akira MIYOSHI\*\*\*\*

\*Department of Applied Biology, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology,  
Matsugasaki, Kyoto 606-8585, Japan

\*\*Center for Bioresource Field Science, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology,  
Saga-Ippongi-cho, Ukyo-ku, Kyoto 616-8354, Japan

\*\*\*3-A-506 Mukaijima New Town, 151-30 Mukaijima-ninomaru-cho, Fushimi-ku, Kyoto 612-8141, Japan

\*\*\*\*Kinugasa Textile Research Institute, The Kinugasa-kai Foundation, 29 Shimohakubai-cho,  
Kitano, Kita-ku, Kyoto 603-8326, Japan

### Abstract

It has been reported that sericin possesses antioxidant activity, tyrosinase inhibitory activity, cell growth promoting activity, UV absorption property, moisture retention ability, and high biocompatibility. Due to these characters, sericin is being applied to cosmetics, medicine, functional food, and so on. In this study, the properties of sericin were compared among silkworms (Shunrei×Shogetsu and Ringetsu×Kansen) and wild silkmoths, Japanese tusser (*Antheraea yamamai* Guerin-Meneville), Japanese tusser LY (*Antheraea yamamai* Guerin-Meneville), Chinese tusser (*Antheraea perny* Guerin-Meneville), and Eri silkworm (*Samaia ricini* Anderson). Sericin of wild silkmoths possesses higher antioxidant activities than those of silkworm. Among 6 species, sericin of Japanese tusser and Japanese tusser LY showed the highest antioxidant activity. In contrast, only sericin produced by Ringetsu×Kansen showed significant inhibitory activity against tyrosinase, one of melanin synthesizing enzymes. These results indicate that it is necessary to select suitable sericin for a practical utilization such as cosmetic and medicine.

Key Words : Sericin, Silkworm, Wild silkmoth, Antioxidant, Tyrosinase inhibition

## 1. はじめに

絹糸を生産する絹糸昆虫は家蚕と野蚕に大別される[1]。家蚕はカイコガ科に属する桑葉を食べて育つ一般的な蚕であり、その多くは人工的に家畜として飼養されている。一方、野蚕は家蚕以外の絹糸虫を総称したもので、鱗翅目のカイコガ科・ヤマユガ科・カレハガ科・ギョウレツケムシ科

などに属する昆虫のことを指し、種類により食草がそれぞれ異なっている。概して、実用性のある繭を作るものを野蚕と呼ぶことが多く、サクサン、テンサン、インドサクサン、エリサンなどが衣料原料として利用されている。

繭糸は主にフィブロインとセリシンの2種類のタンパク質から構成され、2次的成分としてロウ質、炭水化物、色素、無機物なども含まれている

\*連絡先：京都工芸繊維大学繊維学部応用生物学科、606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町、  
E-mail : kame@kit.ac.jp、TEL 075-724-7553

\*\*連絡先：京都工芸繊維大学繊維学部附属生物資源フィールド科学教育研究センター、  
616-8354 京都市右京区嵯峨一本木町1、E-mail : ichida@kit.ac.jp、TEL 075-861-0741

\*\*\*連絡先：612-8141 京都市伏見区向島二ノ丸町151-30 向島ニュータウン3-A-506

\*\*\*\*連絡先：財団法人衣笠会繊維研究所、603-8326 京都市北区北野下白梅町29、  
E-mail : zai-kinugasakai@nifty.ne.jp、TEL 075-461-5949

[1]。繊維状タンパク質フィブロインは繊維として古来より利用されてきたが、セリシンは操糸の際に解じょ率を左右し、精練の過程で取り除かれることから、この観点におけるセリシンの性質や廃棄セリシンの処理に関する基礎研究がなされてきた[2,3]。しかし、近年になりセリシンが種々の機能性を有していることが見出され、その応用的展開が図られるようになった。そのセリシンが持つ機能性には、保湿作用、紫外線吸収能、抗酸化力、メラニン合成に参与するチロシナーゼの阻害活性、細胞増殖促進能などが知られている[4]。また、セリシンは生体適合性にすぐれており、それらの特性をいかして化粧品や医薬品、食品などへの応用が試みられ、すでにいくつかの企業によってセリシンを配合した基礎化粧品、入浴液、石鹸などが販売されている。

本研究では、機能性に優れたセリシンを見出すため、家蚕および野蚕が作り出すセリシンについてその機能性の比較を行った。家蚕から春嶺×鐘月の白色繭、輪月×漢川の黄色繭の2品種の繭、野蚕からサクサン、サクサンLY、テンサン、エリサンの4種の繭のセリシンを熱水抽出し、抗酸化活性およびチロシナーゼ阻害活性の差異を明らかにした。

## 2. 材料と方法

### 2. 1 供試繭

京都工芸繊維大学繊維学部附属生物資源フィールド科学教育研究センターで桑葉飼育された家蚕2品種（春嶺×鐘月、輪月×漢川）、野蚕4種（サクサン、サクサンLY、テンサン、エリサン）の計6種類の繭を用いた。サクサンLYの繭は紫外線照射により黄色蛍光を発生し、蛍光を発生しないサクサン繭と区別するためにサクサンLYと命名したものである。春嶺×鐘月は白色繭であるのに対し、輪月×漢川は黄色繭である。また、サクサンおよびサクサンLYは薄褐色繭、エリサンは白色繭、テンサンは緑色繭である。

### 2. 2 セリシンの調製

繭の毛羽を除去した後、ハサミで約5×5mm

四方の大きさにカットし、秤量した。重量の20倍量の蒸留水を加え121℃で1時間加熱し、セリシンを抽出した。ただし、エリサン繭は吸水量が多かったため、40倍量の水を加えた。抽出液をろ紙でろ過した後、凍結乾燥して以後の実験に供した。

### 2. 3 分子量測定

適当量のセリシンに6M尿素および0.8M NaClを含む0.1M Tris-HCl pH7.2を加えて、セリシンをほぼ完全に溶解した。遠心分離（15,000rpm、5分、4℃）後、フィルター（0.20μm）を用いて不溶物を除去し、FPLC（Amersham Pharmacia Biotech）を用いてSuperdex 75 カラム（1×30cm、Amersham Pharmacia Biotech.）でゲルろ過した。流速は0.3ml/min、チャートスピードは5mm/min、セリシンの検出は280nmの吸収によって行った。標準タンパク質（牛血清アルブミン：分子量66,000、卵オボアルブミン：分子量45,000、大豆Kunitzuトリプシンインヒビター：分子量24,000、ニワトリ卵白リゾチーム：14,300、インシュリン：5,938、還元型グルタチオン：307）の溶出位置から作成した標準曲線を用いて分子量を算出した。

### 2. 4 アミノ酸組成分析

0.2mgのセリシンに100μlの0.2% 3-(2-アミノエチル)インドールを含む4Nメタンスルホン酸（和光純薬工業）を加え、真空封管した後、110℃で24時間加水分解した。500μlのクエン酸緩衝液（pH2.2）に溶解した後、10μlをアミノ酸分析計（L-8500A、日立）で分析した。

### 2. 5 吸収スペクトル

0.1%セリシン水溶液の吸収スペクトル（220nm~500nm）を分光光度計（U-3300、日立）を用いて測定した。

### 2. 6 DPPH（1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル）測定

2mgのセリシンに800μlの蒸留水を加え、Vortex攪拌してセリシンを溶かした。遠心分離（15,000rpm、10分、4℃）によって不溶物を除去し、得られたセリシン溶液を蒸留水で段階希釈し

て使用した。

遮光した容器にDPPH溶液 (1 mg DPPH/6.25 mlエタノール) を作製し、サンプル100  $\mu$ lに対してエタノール100  $\mu$ lおよびDPPH溶液50  $\mu$ lを加え、攪拌後、室温で30分間放置した。遠心分離 (15,000rpm、5分、室温) を行い、析出した不溶物を除去した。混合溶液200  $\mu$ lを96穴マイクロプレート (Becton Dickinson Labware) に分注し、マイクロプレートリーダー (CORONA ELECTRIC MTP-120) を用い、550nmの吸収を測定した。セリシン量は反応溶液中の重量 ( $\mu$ g) で示した。また、標準物質として既知抗酸化物質であるアスコルビン酸 (ナカライテスク) を用いた。DPPHは和光純薬工業社製を使用した。

## 2. 7 TBARS (チオバルビツール酸反応物質) 測定

TBARS測定はKato[4], Su[5], Nanua[6]らの方法を参考に以下の方法で行った。ラット (♂、Wistar、7~8週齢) 脳の重量を測定し、その10倍量の0.1Mリン酸緩衝液、pH7.5を加え、磨砕した後、遠心分離 (15,000rpm、5分、4℃) によって上清を得た。700  $\mu$ lの0.1Mリン酸緩衝液、pH7.5に種々の濃度になるように溶解したセリシンをホモジェネート400  $\mu$ lに加え、37℃で120分間インキュベートした。100  $\mu$ lのインキュベート溶液に、8%トリクロロ酢酸500  $\mu$ lと0.67%チオバルビツール酸溶液 (ナカライテスク) 400  $\mu$ lを加え、95℃で15分間加熱した。氷上で5分間冷やした後、遠心分離 (15,000rpm、15分、4℃) によって得られた上清の553nmの蛍光 (励起: 515nm) を蛍光光度計 (F-4500、日立) を用いて測定した。セリシン濃度はラット脳ホモジェネートとセリシンの混合液中の濃度% (w/v) で示した。標準物質として1.1.3.3-テトラエトキシプロパン (ナカライテスク) を用いた。

次に、ラット脳ホモジェネート添加後のセリシン濃度を0.032% (w/v) に固定し、インキュベーション時間を30分、60分、90分、120分、180分、240分と変化させて、先述と同条件でTBARS測定を行った。

## 2. 8 チロシナーゼ活性阻害測定

マッシュルームチロシナーゼ 45.1unit (Sigma, 終濃度9 unit) を含む1/15 Mリン酸緩衝液 (pH 6.5) 150  $\mu$ lに1/15Mリン酸緩衝液、pH6.5に溶解したセリシン300  $\mu$ lを加え、25℃で5分間インキュベートした。反応液中のセリシン終濃度は0.1% (w/v) になるように調製した。インキュベート後、300  $\mu$ lの1.25mM L-DOPA (dihydroxyphenylalanine、ナカライテスク、終濃度0.5mM) 溶液を加えて、分光光度計 (U-3300、日立) を用いて波長475nmの吸収変化を測定した[4,7]。

## 3. 実験結果

### 3. 1 分子量

家蚕2品種 (春嶺×鐘月、輪月×漢川)、野蚕4種類 (サクサン、サクサンLY、テンサン、エリサン) の繭を水中で121℃、1時間加熱してセリシンを抽出した。セリシンは熱処理により分子量が低下することが知られているため、本研究で用いたセリシンの分子量をゲル濾過法によって測定した。ゲル濾過の溶出パターンを図1に示す。標準タンパク質の溶出位置から作製した標準曲線をもとに算出した各繭のセリシンの分子量は、春嶺×鐘月52,000、輪月×漢川 51,000、サクサン53,000、サクサンLY 57,000、テンサン51,000、エリサン59,000であり、いずれも50,000から60,000の分子量範囲であった。しかし、野蚕の4種類では分子量数十から数百の低分子量域に高いピークが検出され、その吸収はサクサンが最も大きかった。

### 3. 2 アミノ酸組成

アミノ酸組成分析の結果を表1に示す。サクサン、サクサンLYおよびテンサンのセリシンは家蚕の2種およびエリサンのセリシンに比べてスレオニンの含量が高く、逆にセリシンの含量が低かった。また、水酸基を持つアミノ酸セリンとスレオニンの合計含量は、野蚕よりも家蚕の方が高い値であった。



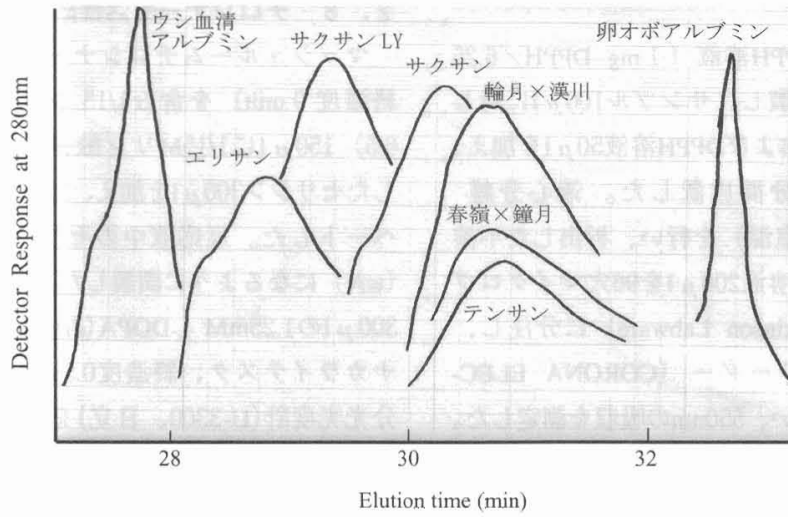


図1. セリシンのゲル濾過クロマトグラフィー。標準タンパク質：ウシ血清アルブミン（分子量66,000）、卵オボアルブミン（分子量45,000）。

表1. セリシンのアミノ酸組成（モル%）

	春嶺×鐘月	輪月×漢川	サクサン	サクサンLY	テンサン	エリサン
Asp	15.60	15.05	15.44	15.37	14.88	14.19
Thr	8.31	7.51	13.85	14.21	15.03	6.49
Ser	33.23	34.03	23.38	23.93	23.59	31.91
Glu	5.01	5.98	6.33	6.36	6.43	8.62
Pro	0.70	0.60	1.18	0.98	1.35	1.78
Gly	15.61	14.34	19.47	19.09	18.50	12.13
Ala	5.06	4.73	3.40	3.20	2.57	4.51
1/2Cys	0.32	0.64	0.30	0.25	0.64	0.88
Val	3.01	2.98	1.04	0.97	1.11	1.44
Met	0.05	0.56	0.21	0.15	0.61	0.60
Ile	0.76	0.82	0.58	0.55	0.86	0.92
Leu	1.21	1.33	0.67	0.62	0.74	0.96
Tyr	3.52	3.29	5.23	5.27	5.73	4.41
Phe	0.40	0.37	0.35	0.32	0.09	0.76
Lys	2.69	3.29	2.23	2.26	1.69	5.10
His	1.22	1.20	2.58	2.60	2.64	3.07
Trp	0.13	0.10	0.08	0.05	n.d.	n.d.
Arg	3.17	3.17	3.69	3.80	3.54	2.22
Total	100	100	100	100	100	100

n.d.: 未検出

### 3. 3 吸収スペクトル

各セリシン試料の吸収スペクトルを図2に示す。280nm付近の紫外線吸収はいずれの野蚕セリシンも家蚕セリシンに比べ大きく、特にサクサンセリ

シンが非常に大きい吸収を示した。サクサンおよびサクサンLYのセリシンは320nm付近、テンサンは340nm付近、輪月×漢川セリシンは360nm付近にも吸収極大を示した。白色繭の春嶺×鐘月お

よびエリサンのセリシンは320nmよりも長波長領域での吸収は小さく、特に春嶺×鐘月セリシンは0.1%の濃度ではほとんど吸収が認められなかった。

### 3. 4 抗酸化活性

セリシンは抗酸化能を有することが知られている。本研究では、DPPH法およびTBARS法の2種類の方法を用いて各セリシンの抗酸化能を評価した。

#### 1) DPPH測定

水溶液中でDPPH (1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル) は紫色を呈する安定なフリーラジカ

ルとして存在する。セリシンのフリーラジカル消去活性をDPPHフリーラジカル量の減少を測定することによって評価した。結果を図3に示す。ポジティブコントロールとしてアスコルビン酸を用いた。春嶺×鐘月は200 $\mu$ gを加えてもDPPHフリーラジカルの消去活性が認められなかったため、図3に含めていない。セリシンを含まないコントロールの吸収の半値を与えるセリシン量、すなわちDPPHフリーラジカルを50%消去するのに必要なセリシン量を図3の結果から求めて表2に示した。

その結果、フリーラジカル消去活性は家蚕セリシンよりも野蚕セリシンの方が強く、サクサンセリシンが最も強い抗酸化能を持つことが明らかに

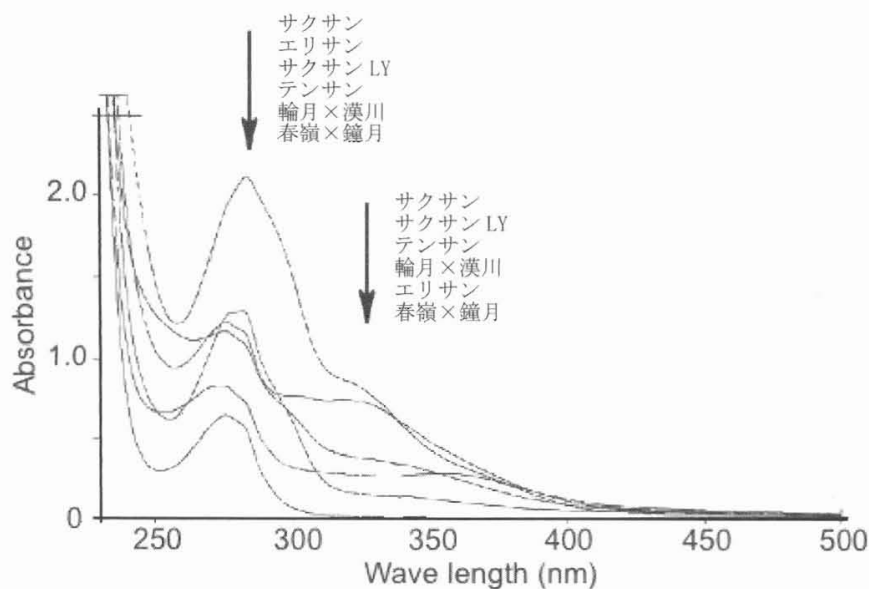


図2. セリシンの吸収スペクトル。

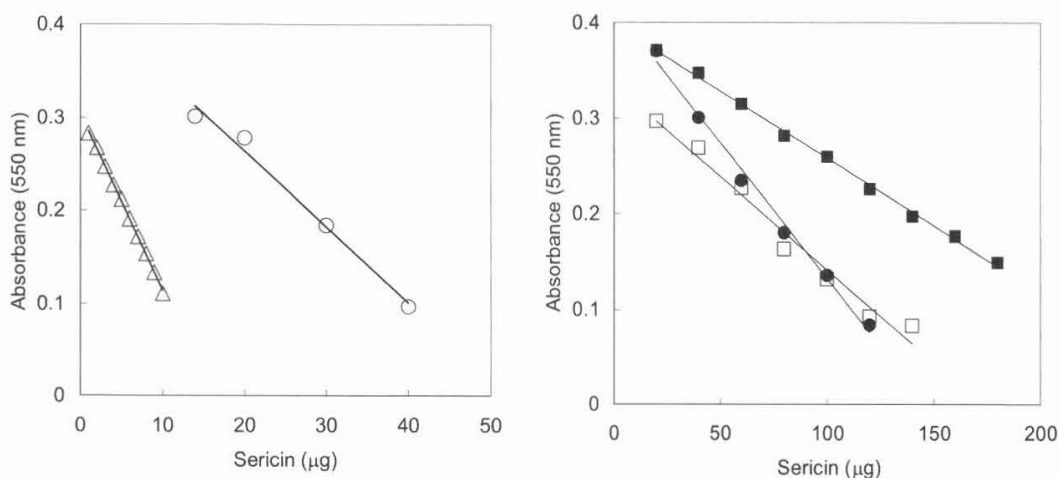


図3. DPPHフリーラジカル消去法によるセリシンの抗酸化力測定。セリシンをDPPH溶液に加え、30分後、550nmの吸収を測定した。テンサン (●)、輪月×漢川 (■)、エリサン (□)、サクサンLY (○)、サクサン (△)。

表2. DPPHラジカル消去率50%を与えたセリシン量 ( $\mu\text{g}$ )

春嶺×鐘月	輪月×漢川	サクサン	サクサンLY	テンサン	エリサン	アスコルビン酸
>200	150.07	13.01	25.59	83.03	80.12	1.23

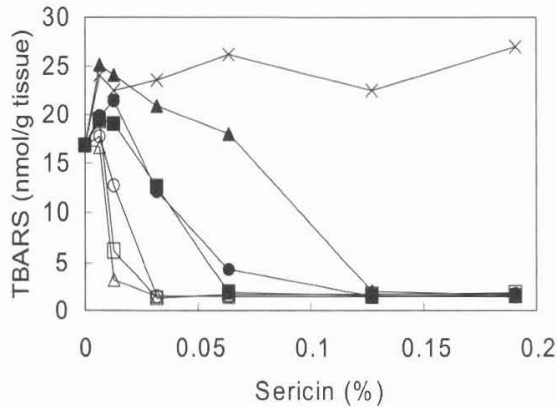


図4. TBARS法によるセリシンの抗酸化力測定 (濃度依存性)。各濃度のセリシンをラット脳ホモジェネートに添加し、120分間インキュベーションした後、チオバルビツール酸反応物質を測定した。励起波長515nm、蛍光波長535nm。コントロール (オボアルブミン) (×)、テンサン (●)、春嶺×鐘月 (▲)、輪月×漢川 (■)、エリサン (□)、サクサンLY (○)、サクサン (△)。

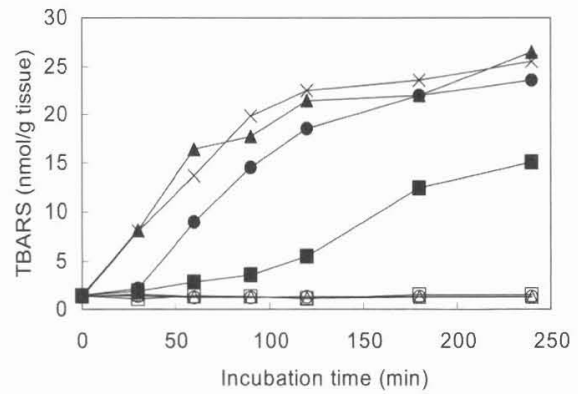


図5. TBARS法によるセリシンの抗酸化力測定 (時間依存性)。セリシンをラット脳ホモジェネートに添加し (終濃度0.032%)、インキュベーション時間を変化させてチオバルビツール酸反応物質を測定した。励起波長515nm、蛍光波長535nm。コントロール (オボアルブミン) (×)、テンサン (●)、春嶺×鐘月 (▲)、輪月×漢川 (■)、エリサン (□)、サクサンLY (○)、サクサン (△)。

なった。最も活性が高いサクサンセリシンは家蚕 (春嶺×鐘月および漢川×鐘月) セリシンと比較すると10倍以上強い活性を有していた。

## 2) TBARS測定

ラット脳ホモジェネートを用いて過酸化脂質の生成をセリシンが抑制するかどうかを検討した。セリシン濃度を変化させて測定した結果、図4に示すようにDPPHフリーラジカル消去活性と同様にサクサンおよびサクサンLYは強い抗酸化活性を示した。また、TBARS測定法ではエリサンセリシンがサクサンセリシンと同程度の強い抗酸化力を示したのに対して、テンサンセリシンは家蚕品種・漢川×輪月のセリシンと同程度のやや弱い抗酸化力であった。春嶺×鐘月セリシンはDPPH法およびTBARS法いずれの測定法においても最も弱い抗酸化力を示した。

次いで、セリシン水溶液をラット脳ホモジェネートと混合し (最終セリシン濃度0.032%)、一定時間ごとに一部をとりTBARS法により過酸化脂質の分解物マロンジアルデヒドを定量した。その結

果、図5に示すようにサクサン、サクサンLY、エリサンのセリシンはいずれも240分間のインキュベーション時間において過酸化脂質の生成を抑制した。しかし、春嶺×鐘月およびテンサンのセリシンはいずれもコントロールとして用いたオボアルブミンとほぼ同程度のチオバルビツール酸反応物質が生成し、脂質の過酸化をほとんど抑制しなかった。

## 3. 5 チロシナーゼ阻害活性

チロシナーゼに対するセリシンの阻害効果を検討した。図6に示すように、輪月×漢川セリシンはチロシナーゼ活性を約58%に阻害した。春嶺×鐘月、エリサン、テンサンのセリシンは弱くチロシナーゼを阻害し、それぞれ86%、89%、95%に阻害した。しかし、サクサンおよびサクサンLYセリシンを加えた場合、セリシンを含まないコントロールに対して124%および114%の活性を示し、チロシナーゼ活性が増強された。

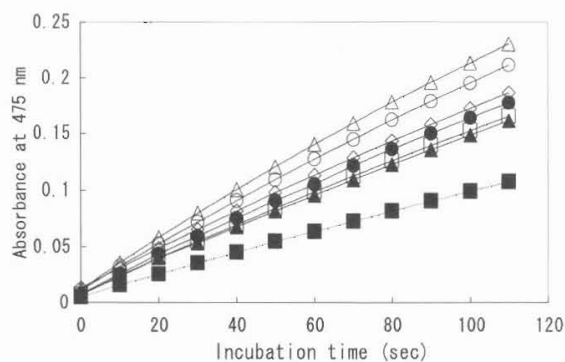


図6. セリシンのチロシナーゼ阻害活性。マッシュルームチロシナーゼにセリシン（最終濃度0.1%）を加えてインキュベート後、基質を添加、475nmの吸収変化を測定することによりチロシナーゼ活性を測定した。コントロール（セリシン無し）（◇）、テンサン（●）、春嶺×鐘月（▲）、輪月×漢川（■）、エリサン（□）、サクサンLY（○）、サクサン（△）。

#### 4. 考察

本研究では、家蚕2品種、野蚕4種のセリシンの機能性について比較検討した。これまでに、家蚕の品種間でのセリシンの機能性に関する比較研究は報告されているが、家蚕と野蚕のセリシンについて系統的に比較・研究されたのは本研究が初めてである。

本研究で用いたセリシンは繭から熱水抽出（121℃、1時間）したものであり、アミノ酸組成分析によりセリシンの抽出を確かめた。表1に示すように、家蚕（春嶺×鐘月および輪月×漢川）のセリシンはセリンが約33%（モル%）、スレオニンが約8%を占めている。一方、野蚕のサクサン、サクサンLYおよびテンサンのセリシンでは、セリンが約23%、スレオニンが14%前後を占めており、家蚕より野蚕のほうがセリン含量が低く、逆にスレオニンの含量が高いという特徴が見られた。それに対し、エリサンセリシンのセリンとスレオニン含量の特徴は家蚕に似ていた。これらの特徴はすでに報告されているものと一致しており[1]、いずれもセリシンが抽出できていることが確かめられた。また、ゲル濾過による分子量測定の結果（図1）、いずれのセリシンも約50,000～60,000程度の分子量範囲であったが、野蚕のセリシンでは低分子領域にも大きなピークが検出され

た。繭の熱水抽出によって得られるセリシンには、セリシタンパク質以外にもフラボノイドなどの低分子量物質をはじめとする種々の成分が含まれていることが報告されている。よって低分子領域にみられるピークはタンパク質以外の成分の可能性が考えられる。

図2に示した吸収スペクトルから、野蚕セリシンは家蚕セリシンに比べて紫外線吸収能が大きいことが分かる。特に、サクサンセリシンは280nm付近の紫外線吸収が大きいことが特徴である。また、春嶺×鐘月セリシンを除く他の全てのセリシンは320nm～400nmの波長域の紫外線を吸収した。日焼け、皮膚ガン、しわなどの原因となる紫外線を吸収する能力は、セリシンの化粧品などへの応用を考える上で重要である。

セリシンの持つ抗酸化活性をDPPHフリーラジカル消去活性法と過酸化脂質を測定するTBARS法の2種類の方法を用いて測定した。その結果、いずれの測定法によってもサクサンセリシンが最も高い抗酸化力を示した。それに対して、春嶺×鐘月セリシンの抗酸化力が最も弱く、傾向としては家蚕に比べて野蚕のセリシンの方が強い抗酸化力を持つことが示された。セリシンの抗酸化力にはセリシンに含まれるフラボノイドおよび尿酸の寄与が大きいとの報告[8]があることから、これら品種間の抗酸化力の差異はフラボノイド色素の種類や量、尿酸の量の差異が反映しているものと考えられる。抗酸化活性が強いサクサン繭は薄褐色であり、その褐色成分が抗酸化力を示した可能性がある。しかし、サクサンに次いで強い抗酸化力を持つエリサンは白色繭であり、同じ白色繭である春嶺×鐘月のセリシンが最も弱い抗酸化力を示すのとは対照的である。これは両セリシンに含まれる呈色しない成分の差異を反映しているものと考えられる。一方、セリシタンパク質を構成するアミノ酸そのものも抗酸化力を持つ事が知られており、セリシタンパク質の抗酸化力への関与も考えられる[9]。

図6に示すように、輪月×漢川セリシンが最も強いチロシナーゼ阻害活性を有していた。春嶺×鐘月、エリサンおよびテンサンのセリシンはいずれも弱いもののチロシナーゼ阻害活性を示した。

いくつかのフラボノイド類がチロシナーゼ阻害活性を有していることが報告されており[10]、チロシナーゼ阻害活性においても抗酸化活性と同様にセリシンに含まれるフラボノイドなどの色素成分が関わっている可能性がある。最も強いチロシナーゼ阻害活性を示した輪月×漢川は黄色繭であり、チロシナーゼ阻害に關与する成分の同定は今後の課題である。一方、サクサンおよびサクサンLYのセリシンを添加した場合、チロシナーゼはコントロールよりもやや強い活性を示した。サクサンセリシンにチロシナーゼの基質L-DOPAのみを加えた場合、L-DOPAの酸化反応はほとんど起こらなかったことことから、熱水抽出して得られるサクサンセリシンはチロシナーゼ活性を有していないことが分かる。また、チロシナーゼとサクサンセリシンのみを混合した場合も、475nmでの吸収に変化は無かった。したがって、サクサンセリシンがチロシナーゼを活性化した可能性が考えられるが、より詳細な解析が必要である。

本研究から、種の違い及び同一種においては品種の違いによってセリシンの機能性が異なっていることが明らかになった。すなわち、抗酸化活性が高いのはサクサンセリシン、次いでエリサンセリシンであった。チロシナーゼ阻害活性が強いのは輪月×漢川セリシンであり、逆に、サクサンセリシンはチロシナーゼ活性を促進している可能性が示唆された。また、サクサンセリシンは大きな紫外線吸収能を有していた。例えば、化粧品などへの応用を考えた場合、抗酸化力が強く、紫外線をよく吸収し、かつメラニン合成に關与するチロシナーゼの阻害活性が強いセリシンが望ましいと考えられる。したがって、化粧品や医薬品などへの応用を図るうえで、それらの機能性の差異からどの種のセリシンが有用であるかを考慮する必要が有る。

## 引用文献

- [1] 皆川 基 (1981) : 絹の科学 pp.58-334 関西衣生活研究会、大阪  
 [2] 羽賀篤信、筒井亮毅、渡辺忠雄 (1980) : 解

じょ率の異なる蚕品種の絹糸腺セリシンの挙動、九州蚕糸、11、65

- [3] 北野 実 (1977) : セリシンのモンモリロナイトへの吸着様式、日蚕雑、46(4)、363-364  
 [4] Kato, N., Sato, S., Yamanaka, A., Yamada, H., Fuwa, N., and Nomura, M. (1998) : Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62(1), 145-147  
 [5] Su C. Y., Chong K. Y., Edelstein K., Lille S., Khardori R., and Lai C. C. (1999) : Constitutive hsp70 attenuates hydrogen peroxide-induced membrane lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265(2), 279-284  
 [6] Nanua, J.N., McGregor, J. U., and Godber, J. S. (2000) : Influence of high-oryzanol rice bran oil on the oxidative stability of whole milk powder. *J. Dairy Sci.* 83(11), 2426-2431  
 [7] Saboury, A. A., Karbassi, F., Haghbeen, K., Ranjbar, B., Moosavi-Movahedi, A. A., and Farzami, B. (2004) : Stability, structural and suicide inactivation changes of Mushroom tyrosinase after acetylation by N-acetyl-imidazole. *Biol. Macromol.* 34, 257-262  
 [8] 山崎昌良 (2002) : セリシン抽出物の抗酸化作用について。(財)大日本蚕糸会 シルクだより No.10, 2-3  
 [9] Masuda, T., Nakano, S., and Kondo, M. (1973) : Rate constants for the reactions of OH radicals with the enzyme proteins as determined by nitrosodimethylaniline method. *J. Radiat. Res.* 14, 339-345  
 [10] Badria, F. A. and elGayar, M. A. (2001) : A new type of tyrosinase inhibitors from natural products as potential treatments for hyperpigmentation. *Boll. Chim. Farm.* 140(4), 267-271

# RNA結合タンパク質の発現を抑制した カイコ細胞におけるCypovirus 1の感染

小谷英治\*・林 幸之\*\*

## Cypovirus 1 Multiplication in the BmTRN-1 Knockdown Cultured cells

Eiji KOTANI\* and Yoshiyuki HAYASHI\*\*

\*Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

\*\*Kinugasa Textile Research Institute, The Kinugasa-kai Foundation, 29 Kitano Shimo-Hakubai-cho,  
Kita-ku, Kyoto 603-8326, Japan

### Abstract

A TIA-1-type RNA-binding protein (BmTRN-1) identified from midgut of the silkworm, *Bombyx mori*, has significant homology with human TIA-1 and TIAR, recently reported to function as important factors for either splicing or translation. In order to investigate whether the BmTRN-1 activity can relate to the RNA virus growth in the cytoplasm, we constructed the BmTRN-1 knockdown cells by introducing the modified antisense oligonucleotide and small inhibitory double stranded RNA (siRNA) of BmTRN-1 mRNA sequence into BmN4 cells which were concurrently infected with the *Bombyx mori* Cypovirus 1 (BmCPV-1). Effective declines in the amount of both 42.5 and 44.1kDa BmTRN-1 protein bands were shown for at least 48 h after the antisense DNA and siRNA transfection. Significant increases of the BmCPV-1 polyhedrin protein detectable by the Western blotting using the specific antiserum were shown after 108 h post inoculation. Also, number of cells containing polyhedra observable under the light microscopy was elevated in the BmTRN-1 knockdown cell cultures after 144 h post inoculation. These results indicate that BmTRN-1 which have been shown as an RNA-binding protein regulating the cellular transcripts, also functions to limit the early processes of BmCPV-1 infection, possibly interacting the viral RNAs.

## 1. まえがき

RNA認識配列 (RNA-recognition motif, 以後 RRMと略す)を持つRNA結合タンパク質群は、さまざまな生体内過程、特に細胞活動や発生における転写後の諸過程に関わると考えられている[1,2]。RRM含有RNA結合タンパク質群の中で、哺乳類のTIA-1、およびTIARは1990年代初頭にT細胞内の細胞核崩壊機能を持つ顆粒内成分として同定された[3,4]。両タンパク質が細胞の中で核DNAの断片化を伴う細胞死 (アポトーシス) の誘導に関与することが報告されていたが、2000年代以降はTIA-1およびTIARの哺乳類翻訳機構との関連、お

よび細胞死関連遺伝子の初期転写産物エキソン配列が関与したmRNAスプライシングなどに重要な働きを持つことも判明してきた[5-8]。これらを統括してTIA-1およびTIARタンパク質は、細胞内で転写後の過程、特にスプライシングの促進や翻訳の阻害に関わると解釈され、関連過程の一部がアポトーシス現象に対しても影響を及ぼすと推察されている[5-7]。

昆虫種では、ショウジョウバエからTIA-1同属群の相同性遺伝子 (*Rox8*) が単離されており、蛹期の卵形成に関わる可能性が示唆されている[9]。カイコでもTIA-1相同性遺伝子の単離が行われてきた (カイコTIA-1-related nucleolysin, BmTRN-1)

\*連絡先：京都工芸繊維大学繊維学部、606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町  
E-mail: kotani@ipc.kit.ac.jp、TEL 075-724-7774、FAX 075-724-7760



[10,11]。その遺伝子解析の結果から、BmTRN-1は388個のアミノ酸配列からなり、N末端側にはRox8およびTIA-1と同様のRRM領域の繰り返しと、C末端には他のTIA-1ファミリータンパク質とは有意な相同性を示さないタンパク質相互作用領域にあたる配列が認められた[10]。また大腸菌を用いて調製した組み換えタンパク質による解析から、BmTRN-1の1および2番目のRRM領域にpoly(A)およびpoly(U)RNAに対する結合活性が認められ、このRRM領域の組み換えタンパク質をトランスフェクション法で取り込ませたカイコ培養細胞内においてDNA断片化が観察された[10,11]。さらにBmTRN-1のmRNA存在量は幼虫-蛹変態期に上昇することも明らかとなった。加えて、BmTRN-1の培養細胞内における恒常的な発現を人為的に抑制した場合に、発現ベクターによる外来タンパク質の発現量増加および外来転写産物の存在量増加が認められた。こうした結果から、BmTRN-1は変態期に不要となる旧組織の転写産物の効率的な排除に重要な役割を持つことが推察される[10]。

BmTRN-1の標的RNAに対する認識特性と生体内におけるこの物質の存在意義を見出すことは広く生物界にあるRNA結合タンパク質群の生物学的重要性を理解することに貢献すると考えられる。したがって、核由来転写産物への反応性が認められることに加え、細胞外由来の細胞質局在性核酸に対するBmTRN-1の関与を明らかにすることは重要である。このために、外来のRNAウイルスの感染過程に対するBmTRN-1の機能を調べる必要がある。本研究では、人為的にBmTRN-1発現を低減させた培養細胞BmN4におけるカイコ細胞質多角体病ウイルス、*Bombyx mori* Cypovirus 1 (BmCPV-1) [12,14]の感染について調べた。

## 2. 材料および方法

### 2.1 培養細胞

カイコ胚由来BmN4細胞は、市販ESF921昆虫細胞培養液（エクस्पレーションシステム製）に最終濃度14%の子牛血清を添加した混合培地を用いて25℃下で培養・継代した[13]。

### 2.2 BmTRN-1の発現抑制処理

#### (a) アンチセンスオリゴヌクレオチド

BmTRN-1の一過的ノックダウンのために、このmRNAの299-322部分塩基配列（5'-CGATTCTGGAGACAGATCGCCC-3'）に対する相補的配列の5'末端にphosphothioate修飾したオリゴDNAをアンチセンスヌクレオチドとして使用した。同様に5'末端を修飾したセンスヌクレオチド（塩基番号690-711）を対照実験に用いた。

#### (b) siRNA

BmTRN-1の一過的ノックダウンのため、塩基番号213-237のmRNA部分配列に相当する20 μMの合成小干渉二本鎖RNA（5'-CCUCGACAAGGAAGAUGAAGGUUAAU-3'）とその相補配列とのステルスRNAi（インビトロジェン製）を用いた。

#### (c) 化学的トランスフェクション法

1.5ml混合培地中の $0.7 \times 10^6$ 単層細胞を35mmプラスチックプレートに播いた。100 μlの無血清ESF921に0.5 μgのオリゴヌクレオチド、および3 μlのロッシュ製FuGene6試薬を混合し、室温で15分インキュベートした。この混合液を細胞プレートに滴下し、その後室温で5時間インキュベートする間に細胞内にDNAおよびsiRNAを取込ませた。培地を1.5mlの新しい混合培地と交換し、室温での培養を24時間続けた。この処理を行った細胞の培地中に、ウイルス接種液を滴下した。

#### (d) ウェスタンブロッティング法

BmTRN-1の抑制を確認するために、同タンパク質を免疫したウサギ抗血清から精製したIgG抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い、細胞内の同タンパク質存在量を調べた。トランスフェクション以後、培養した細胞をSDS-PAGE用サンプル処理液200 μlに溶解させたものを電気泳動用サンプルとした。3 μgタンパク質を含む10 μlサンプル液を12% SDS-PAGEの各レーンに注入した。電気泳動終了後、分離したタンパク質を電気泳動的にPVDF膜に転写した。このPVDF膜を5%スキムミルクを含む抗体反応用リン酸緩衝液（pH 7.4）内でブロックした後、5℃で一晩抗体（1:5000）と反応させた。同抗体反応用リン酸緩衝液で洗浄後、二次抗体（1:5000）とPVDF膜を室温3時間反応させ、洗浄後発色させた。発色に

はウエスタンブラスキット (アマシャム・ファルマシア製) を用いた。

### 2. 3 カイコ細胞質多角体病ウイルス

*Bombyx mori* Cypovirus-1 (BmCPV-1) H株[14]に感染したカイコ中腸を0.1% SDSを含む10mMのTris-KCl緩衝液 (pH7.4) を用いて磨砕し、不溶性の多角体画分を遠心により回収した。さらに同緩衝液を用いた洗浄を3回以上行い、調製多角体とした[15]。多角体をアルカリ溶液 (50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-50mM NaCl) に懸濁し、室温1時間穏やかに浸透することで溶解させた。多角体から放出されたウイルス粒子を22 $\mu$ mろ過フィルターを用いて滅菌した後これを接種した。本研究では2.0 $\times 10^8$ 多角体から放出されたウイルス粒子を含む接種用懸濁液1 $\mu$ lを調製した。0.7 $\times 10^6$ 細胞に対しこのウイルス液を1,2,および5 $\mu$ lを用いて接種した。

### 2. 4 アンチセンス抑制中の細胞における

#### BmCPV-1の増殖

ウイルス接種後の細胞を回収し、細胞内タンパク質中のBmCPV-1ポリヘドリンタンパク質を特異抗血清を用いたウエスタンブロットティングにより検出した。血清にはBmCPV-1のH株由来ポリヘドリンを免疫して得られたウサギ製のものを用いた。ポリヘドリンタンパク質を検出することにより、BmTRN-1ノックダウン処理が及ぼすBmCPV-1の感染過程への影響を調べた。

## 3. 結果

### 3. 1 BmTRN-1の人為的発現抑制

BmTRN-1の細胞内機能とカイコ細胞に対する細胞質多角体病ウイルス (BmCPV-1) の感染との関連を調べる目的で、培養細胞BmN4におけるBmTRN-1発現の抑制処理を行った。まずアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてBmTRN-1の発現抑制処理を施したBmN4細胞におけるBmTRN-1タンパク質量の変化を調べた (Fig. 1a)。培養細胞内での外來タンパク質発現量増大効果を最も顕著に引き起こすアンチセンスDNA量は細

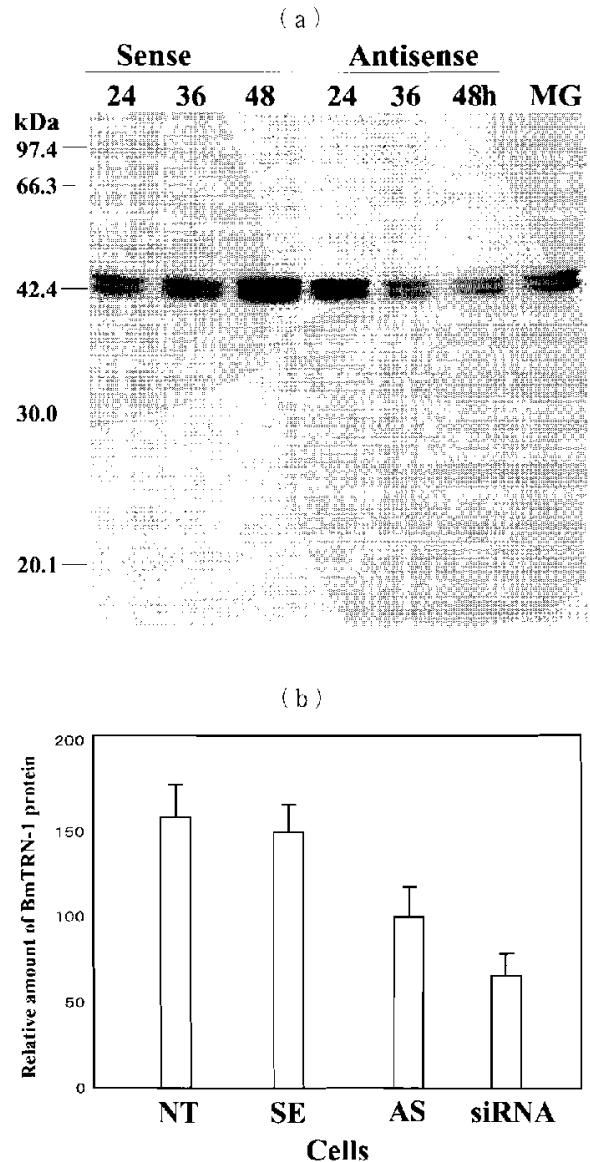


Fig. 1. BmTRN-1 knockdown in the BmN4 cells (a) Western blotting of proteins (3 $\mu$ g) from the cells treated with sense and antisense DNA of the BmTRN-1 sequenc. (b) Comparison of densitometric analyses of the sum of BmTRN-1 42.5 and 44.1 kDa band from the cells transfected with sense (SE) and antisense DNA (AS), and BmTRN-1 siRNA (60 pmoles/ plate), and the cells treated with only the transfection reagent (NT).

胞0.7 $\times 10^6$ /plate細胞あたり0.375-0.750 $\mu$ gであるため、発現抑制処理には1 plateあたり0.5 $\mu$ gを用いた[10]。特異抗体を用いたウエスタンブロットティングによりBmTRN-1は、培養細胞および幼虫中腸皮膜ともに分子質量42.5kDaおよび44.1kDaの二本のタンパク質バンドとして検出される[10]。こ

これらのBmTRN-1タンパク質バンドは、センスDNAを使用した対照区に比べ、アンチセンス抑制24時間および48時間までに細胞内における存在量が明らかに減少した (Fig. 1a)。すなわちこの操作で人為的にタンパク質新生が抑制された結果、細胞活動によって継続的に消費される量が新たに補充されないために、検出されるBmTRN-1存在量が顕著に減少したと考えられる。またsiRNA分子が及ぼすBmTRN-1存在量への影響を調べた (Fig. 1b)。その結果トランスフェクション処理から24時間後のそれぞれの区における42.5kDaおよび44.1kDa両タンパク質バンドの総和をデンストメトリー比較したところ、同数の細胞あたり60 pmol/plate使用した場合に、アンチセンスオリゴDNAを用いた場合に比べて約1.5倍のBmTRN-1抑制効果が見られた。これに対して、センスオリゴDNAを用いた場合には有意なBmTRN-1抑制効果は検出されなかった。

### 3. 2 BmTRN-1ノックダウン細胞におけるBmCPV-1の感染

BmTRN-1の配列を持つ核酸を取り込ませる処理を終えてから24時間後の細胞にBmCPV-1を接種した。「材料および方法」で述べた接種法では、常にこの細胞において感染144時間後に多角体形成を顕鏡で確認できるほぼ最小量のウイルス量を用いている。Table 1には、144時間目に観察される感染細胞数の割合を記録した。顕微鏡下で細胞質に広範囲にわたり透過度の低い明確な多角体集合塊が観察されたものを感染細胞とした。プレートあたりランダム抽出した10<sup>3</sup>個細胞あたりの感染細胞数は、対照区であるトランスフェクション処理をしていない細胞、およびBmTRN-1のセンスDNAを取り込ませた細胞に比べ明らかにアンチセンスDNAおよびsiRNA分子を取り込ませた実験区で増大した。またsiRNAを用いたBmTRN-1ノックダウン細胞の方がアンチセンスDNAの場合に比べ高い多角体形成が確認された。

また多角体タンパク質量を抗体によるウェスタンブロットティングで比較した結果 (Fig. 2)、感染細胞数の比較結果に対応するように、BmTRN-1のノックダウン処理を行った細胞区において、

(Table 1) Effect of the BmCPV-1 polyhedra formation in cells by the BmTRN-1 knockdown.

	Treatments			
	non	sense DNA	antisense DNA	siRNA
cells	44.8*	58.9	246	442
infected	(±23.2)	(±25.8)	(±59.1)	(±22.9)

\* : Average numbers of the cells containing visible polyhedra among the randomly-selected 1000 cells in each dish and standard error of the mean calculated on the data from the three rounds of experiments.

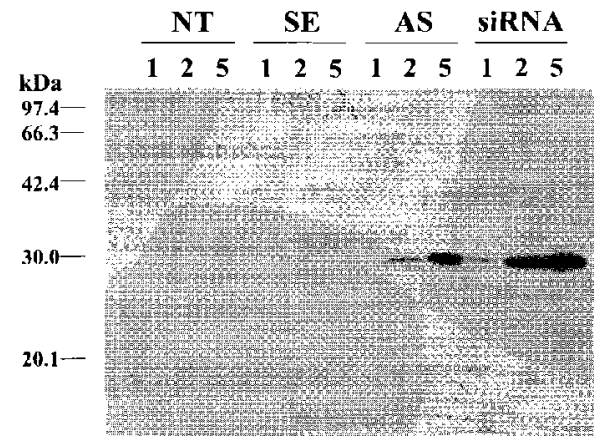


Fig. 2. Expression of the polyhedrin protein of the infected BmCPV-1 in the BmTRN-1 knockdown cells. Solutions containing the BmCPV-1 virion (1, 2 and 5  $\mu$ l) were added to the cell culture treated with no nucleic acids (NT), with sense (SE) and antisense DNA (AS), and siRNA synthesized on the basis of the BmTRN-1 sequence. The polyhedrin protein band in each culture 108 h after the BmCPV-1 infection was detected by a western blotting using the specific antiserum.

顕著な多角体タンパク質発現量の増大が認められた。

本論文の遺伝子発現ノックダウン法は、実質的には処理後48時間までが効果が高く、また72時間経過程度までの効果しか発揮できないため、したがってこれらの結果はウイルスの感染初期段階でのBmTRN-1のノックダウンによりBmCPV-1感染過程が活発化したことを示している。

## 4. 考察

BmTRN-1遺伝子の発現は、個体の組織においては変態に伴う生体変化の過程で上昇するが、胚由来培養細胞においても微量ながら一定量ずつ発現していることがすでに明らかとなっている[10]。BmTRN-1遺伝子の発現には、組織および発育ステージによって様々な生理学的意義があると予想されるが、その作用機作としては転写産物との相互作用・転写産物の制御であると考えられる[10]。Fig. 2に示される様な、BmTRN-1遺伝子産物のノックダウン処理中のBmCPV-1感染処理の結果、このウイルスの多角体タンパク質の生合成量が対照区のものに比べて増大した。この結果は、BmTRN-1タンパク質が細胞内環境において転写産物制御に関わることに加え、BmCPV-1の感染過程の何らかのステップを阻害していることを意味している。本ウイルスは感染成立後、ウイルス粒子に付着していたRNA依存RNAポリメラーゼの働きによりコード遺伝子の転写を行い、細胞質のvirogenic stroma内でタンパク質合成、二本鎖RNAゲノム合成、そして娘ウイルスおよび多角体結晶の合成が進むとされる[14]。BmTRN-1がRNA結合タンパク質であり、ポリAおよびポリU結合性は認められるものの、このウイルスのゲノム二本鎖RNAの直接的な排除に関わるとは考えにくい。またBmCPV-1自体は感染初期の段階でカイコ細胞のタンパク質を利用するという報告もなされていないため、ウイルスの感染を促進するBmN4細胞由来タンパク質がBmTRN-1による発現抑制を通常受けているという推測も妥当ではない。直接的証明は今後必要であるが、現段階ではBmTRN-1はBmCPV-1のmRNAに対する排除機能を有していると推察した。すなわち、BmTRN-1はウイルスの感染初期の段階からmRNA排除などの手段によりカイコ細胞側に必要な生体防御の役割を担っていると考えられる。カイコ細胞がBmCPV-1に感染した際のBmTRN-1遺伝子の発現量変動については今のところ明らかではないが、もしウイルス感染によってBmTRN-1遺伝子発現が促進されるならば、ウイルス感染の何らかの細胞内生体反応に呼応して作動する転写プロモター

の機能解明につながる手がかりがBmTRN-1ゲノム遺伝子の解析から得られるものと期待される。

TIA-1ファミリーのタンパク質の細胞内機能とウイルスの増殖との関係について、すでに以下のような報告がなされている。すなわちLiら(2002)によれば、哺乳類細胞内でウェストナイルウイルスのゲノムRNA相補鎖にある3'ステムループ領域にTIA-1およびTIARタンパク質が相互作用することが明らかにされた[16]。また3'ステムループ領域とTIARタンパク質の結合によりこのウイルスゲノムの複製が促進されることも示されている。TIA-1にはこの機能はないとされており、類似タンパク質でありながら両者の機能に大きな違いが見られる。さらに具体的な作用機作はいまだ不明であるが、TIA-1遺伝子発現を抑制したノックアウト細胞で、Sindbis virus (ssRNA)、Vesicular stomatitis virus (ssRNA)、そしてHSV-1 (dsDNA)の各ウイルスの増殖が活発化したとされる[16]。しかしHSV-1のようなDNAウイルスおよびVaccinia virusに対する増殖阻害活性は弱いとされている。したがって、こうしたTIA-1ファミリータンパク質には昆虫・哺乳類の種の違いを超える共通した役割として、細胞外から侵入して細胞質で増殖するRNAと相互作用する機能があると考えられる。現在までにTIA-1と各種ウイルスの核酸との結合についての具体的な報告はなされておらず、BmCPV-1のRNAゲノムあるいはmRNAとBmTRN-1との特異的結合について明らかにしていく必要がある。

## 引用文献

- [1] Burd, C.G., and Dreyfuss, G., 1994. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* 265, 615-621.
- [2] Kenan, D.J., Query, C.C., and Keene, J.D., 1991. RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem. Sci.* 16, 214-220.
- [3] Tian, Q., Streuli, M., Saito, H., Schlossman, S.F., and Anderson, P., 1991. A polyadenylate binding protein localized to the granules

- of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. *Cell* 67, 629-639.
- [ 4 ] Kawakami, A., Tian, Q., Duan, X., Streuli, M., Schlossman, S.F., and Anderson, P., 1992. Identification and functional characterization of a TIA-1-related nucleolysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 8681-8685.
- [ 5 ] Kedersha, N., Cho, M.R., Li, W., Yacono, P.W., Chen, S., Gilks, N., Golan, D.E., and Anderson, P., 2001. Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 151, 1257-1268.
- [ 6 ] Kedersha, N.L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., and Anderson, P., 2000. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell. Biol.* 147, 1431-1442.
- [ 7 ] Gatto-Konczak, F.D., Bourgeois, C., Guiner, C.L., Kister, L., Gesnel, M.-C., Stevenin, J., and Breathnach, R., 2000. The RNA-binding protein TIA-1 is a novel mammalian splicing regulator acting through intron sequences adjacent to a 5' splice site. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6287-6299.
- [ 8 ] Guiner, C.L., Lejeune, F., Galiana, D., Kister, L., Breathnach, R., Stevenin, J., and Gatto-Konczak, F.D., 2001. TIA-1 and TIAR activate splicing of alternative exons with weak 5' splice sites followed by a U-rich stretch on their own pre-mRNAs. *J. Biol. Chem.* 276, 40638-40646.
- [ 9 ] Brand, S., and Bourbon, H.M., 1993. The developmentally - regulated *Drosophila gene rox8* encodes an RRM-type RNA binding protein structurally related to human TIA-1-type nucleolysins. *Nucleic acids Res.* 21, 3699-3704.
- [10] Kotani, E., Ohba, T., Niwa, T., Storey, K. B., Storey, J. S., Hara, S., Saito, H., Sugimura, Y., and Furusawa, T., 2003. De novo gene expression and antisense inhibition in cultured cells of BmTRN-1, cloned from the midgut of the silkworm, *Bombyx mori*, which is homologous with mammalian TIA-1/R. *Gene* 320, 67-79.
- [11] Ohba, T., Saito, H., Sugimura, Y., Furusawa, T., and Kotani, E., 2004. Induction of genomic DNA fragmentation by introduction of the BmTRN-1 RNA binding domain into cultured cells of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Biotech. Sericol.* 71, in press.
- [12] Belloncik S. (1989) Cytoplasmic polyhedrosis viruses-Reoviridae. *Adv Virus Res.* 37, 173-209.
- [13] Brown, M., and Faulkner, P., 1997. A plaque assay for nuclear polyhedrosis viruses using a solid overlay. *J. Gen. Virol.* 36, 361-364.
- [14] Hayashi, Y., and Bird, F. T. 1970. The isolation of cytoplasmic polyhedrosis virus from the white-marked tussock moth *Orgyia leucostigma* (Smith). *Canadian J. Microbiol.* 16, 695-701.
- [15] Mori, H., and Kawase, S. 1983. Alkaline protease in cytoplasmic polyhedra of the silkworm, *Bombyx mori*. (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 18, 342-350.
- [16] Li, W., Li, Y., Kedersha, N., Anderson, P., Emara, M., Swiderek, K. M., Moreno, G. T., and Brinton, M. A., 2002. Cell proteins TIA-1 and TIAR interact with the 3' stem-loop of the West Nile Virus complementary minus-strand RNA and facilitate virus replication. *J Virol.* 76, 11989-12000.

# カイコの絹糸腺における ソルビトール-6-リン酸脱水素酵素 およびトレハラーゼについて

定金恵子\*・古澤壽治\*・林 幸之\*\*

## Sorbitol-6-phosphate Dehydrogenase and Trehalase in the Silk Glands of the Silkworm, *Bombyx mori*

Keiko SADAKANE\*, Toshiharu FURUSAWA\* and Yoshiyuki HAYASHI\*\*

\*Center for Bioresource Field Science, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology,  
Saga-Ipponki-cho, Ukyo-ku, Kyoto 616-8351, Japan

\*\*Kinugasa Textile Research Institute, The Kinugasa-kai Foundation, 29 Kitano Shimo-Hakubai-cho,  
Kita-ku, Kyoto 603-8326, Japan

### Abstract

The changes of Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase (S6PDH) and trehalase activities in the anterior, middle and posterior silk gland were estimated during the development of the fifth instar larvae. The S6PDH activity increased remarkably toward day 4 in the posterior silk glands, and was also detected in the middle silk glands during the fifth instar, but the activity in both glands decreased after spinning. In contrast, the activity was at trace level in the anterior silk gland, where trehalase activity was increased just before the spinning. The fluctuations of trehalase and S6PDH activity were compared among the anterior, middle and posterior glands. In the anterior glands, trehalase activity was increased remarkably after spinning, but S6PDH in a trace level throughout the fifth instar. In the middle glands, S6PDH activity was higher than trehalase activity before the spinning. The S6PDH activity in the posterior glands was about 2 times higher than that in the middle ones, but trehalase activity was at a trace level, suggesting that utilization of trehalose and sorbitol-6-phosphate is different among the anterior, middle and posterior glands.

Key Words : Silk gland, *Bombyx mori*, trehalase, sorbitol-6-P dehydrogenase

### 1. まえがき

昆虫の血糖はトレハロース[1]で、カイコの絹糸腺ではトレハロースとトレハラーゼ活性が検出される[2,3,4,5]。また、絹糸腺でのトレハロースの利用をみるため、前部、中部および後部絹糸腺でのトレハラーゼ活性について検討すると、中部や後部絹糸腺のトレハラーゼ活性に比べ、前部絹糸腺での活性が高く、このトレハラーゼは体液側

の基底膜に局在している[6]。しかし、5齢起蚕時の体液中にはソルビトール-6-リン酸 (S-6-P) がトレハロースの2倍から3倍量存在する[7]し、このS-6-Pはフィブリン蛋白質の合成が旺盛になる5日目に急激な減少をみせる[8]。また、後部絹糸腺におけるエネルギー供給に関しては、S-6-P利用の面から研究が行われ、後部絹糸腺の培養液にS-6-Pを添加すると、フィブリン蛋白質の合成が促進されるという[9]。これらのことか

\*連絡先：京都工芸繊維大学繊維学部附属生物資源フィールド科学教育研究センター、  
616-8351 京都市右京区嵯峨一本木町1、E-mail: kbspace@kit.ac.jp、TEL 075-861-0714

\*\*連絡先：財団法人衣笠会繊維研究所、603-8326 京都市北区北野下白梅町29、  
E-mail: zai-kinugasakai@nifty.ne.jp、TEL 075-461-5949



ら、後部絹糸腺においては、血糖トレハロースではなくS-6-Pがエネルギー源として利用されている可能性が考えられる。そこで、S-6-Pの絹糸腺における代謝及び利用を明らかにするため、ソルビトール-6-リン酸脱水素酵素 (S6PDH) 活性について、5 齢期の前部、中部及び後部における変動パターンを調べた。さらに、S6PDHとトレハラーゼの両酵素活性の変動を比べ、絹糸腺における炭水化物代謝について考察を加えた。

## 2. 材料および方法

### 2. 1 供試材料

供試材料としては交雑種 (錦秋×鐘和) の家蚕 5 齢幼虫を用い、25℃インキュベータ内で稚蚕 (1~3 齢) を人工飼料 (シルクメイト)、壯蚕 (4~5 齢) を桑葉で飼育した。5 齢起蚕当日を 0 日目としてカウントすると、吐糸は 8 日目に起こり、13 日目 (吐糸 5 日目) には完全に蛹化した。

#### (1) 粗酵素液の調製

5 齢幼虫を氷上にて低温麻酔した後、0.8% 生理食塩水中で解剖を行い、絹糸腺を前部、中部及び後部に分けて摘出した。摘出した組織は 0.8% 生理食塩水に移してよく洗い、余分な水分を除いた後、実験に供試するまで -80℃ で凍結保存した。絹糸腺の採取は、5 齢起蚕当日から吐糸が終了する起蚕 12 日目まで、毎日 10 頭ずつ行った。

トレハラーゼ活性測定のためには、絹糸腺組織を、0.1M NaCl を含む約 5 倍量の 20mM リン酸緩衝液 (pH7.0) を少量ずつ加え、氷で冷やしながらホモゲナイザーを用いて十分に磨砕した。中部絹糸腺については予め乳鉢ですりつぶした後、ホモゲナイザーで磨砕した。磨砕液はその後、15,000×g、4℃で 10 分間遠心して、その上清を回収して粗酵素液とした。

S6PDH 活性測定のためには、絹糸腺組織を、約 3 倍量の 20mM イミダゾール緩衝液 (pH7.2) を少量ずつ加え、氷で冷やしながらホモゲナイザーで十分に磨砕した。この磨砕液を、12,000×g、4℃で 20 分間遠心して、その上清を回収し、Sephadex G-25 Medium (Amersham 社製) により低分子蛋白質を除去した。すなわち、5 ml シリ

ンジにガラスウールを詰め、20mM イミダゾール緩衝液 (pH7.2) で膨潤させた Sephadex G-25 を 5 ml 注ぎ、下部に 15ml 遠心チューブをセットして 4,000rpm で 1 分間遠心した。そして、この Sephadex G-25 に先の 500  $\mu$ l の粗酵素液を重層し、再び 4,000rpm で 1 分間遠心し、遠心チューブに回収された液を粗酵素液とし、S6PDH 活性測定に用いた。

粗酵素液中の蛋白質は、Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad 社製) を用いて定量した。粗酵素液 20  $\mu$ l に染色液 200  $\mu$ l、蒸留水 800  $\mu$ l を加え、室温で 5 分間以上放置した後、波長 595nm で吸光度を測定した。そして予め作成した検量線から、粗酵素液中の蛋白質量を求めた。

#### (2) トレハラーゼ活性測定

トレハラーゼの活性測定には、基質として 0.1 M トレハロース溶液、緩衝液として 0.1M 酢酸緩衝液 (pH5.6) を用いた。エッペンドルフチューブ内で、粗酵素液、基質、緩衝液を、前部絹糸腺では 1 : 5 : 4、中部・後部絹糸腺では 1 : 1 : 1 の割合で混合させて反応液とし、ウォーターバスにて 30℃ で 30 分間反応させた後、沸騰水中で反応を停止させた。

酵素反応によって生成されたグルコース量はソモギーネルソン法 [10] により測定した。すなわち、反応を停止させた反応液 100  $\mu$ l にソモギー液を 200  $\mu$ l 加えてよく攪拌し、沸騰水中で 30 分間反応させた。その後、冷水で冷却し、ネルソン液を 200  $\mu$ l 加えてよく攪拌し、蒸留水 2 ml を加えた後、波長 540nm で吸光度を測定した。そして予め作成した検量線から生成グルコース量を求め、1 分間当たり生成されたグルコース量 ( $\mu$  molcs) をもってトレハラーゼ活性とした。

### 2. 2 S6PDH 活性測定

#### (1) 酵素反応条件の検討

S6PDH 活性測定は、蚕 5 齢幼虫体液のポリオール-リン酸脱水素酵素活性測定方法 [11] を基にした。

S6PDH 反応の条件検討は、最適 pH、最適温度、最適基質濃度及び反応時間の 4 項目について検討した。酵素液としては、5 齢 5 日目の後部絹糸腺

3頭分から抽出し、G-25により低分子画分を除いた粗酵素液を用いた。

#### ①最適pHの検討

pHの異なる合計11種類の緩衝液を以下のように調製した。

- ・20mM イミダゾール-HCl緩衝液 pH5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0
- ・20mM グリシン-NaOH緩衝液 pH9.0、10.0、11.0
- ・20mM Tris-HCl緩衝液 pH8.0、9.0

上記の緩衝液にそれぞれ20mM D-S-6-Pバリウム塩 (Sigma社製)、0.33mM NADP、1.67mM CaCl<sub>2</sub>をマイクロプレート内で混合して全量50 $\mu$ lとし、25℃で10分間インキュベートした。その後、粗酵素液10 $\mu$ lを加えて速やかに攪拌し、25℃で30分間反応させた。反応は氷上にて停止させた。反応液の340 nmの吸光度を測定することでNADPの還元量を求め、1分間当たりのNADP還元量を消費されたS-6-P量 (mM) とし、S6PDH活性とした。また、基質の代わりに蒸留水を入れるもの、粗酵素液の代わりに蒸留水を入れるものの2種類をコントロールとした。

#### ②最適温度の検討

20mM イミダゾール緩衝液 (pH8.0)、20mM D-S-6-Pバリウム塩、0.33mM NADP、1.67mM CaCl<sub>2</sub>をエッペンドルフチューブ内で混合して全量50 $\mu$ lとし、15、25、30、35、40、50、60℃の7種類に設定したインキュベータ中で10分間それぞれインキュベートした。その後、粗酵素液10 $\mu$ lを加えて速やかに攪拌し、それぞれの温度条件下にて30分間反応させた。反応は氷上にて停止させ、S6PDH活性を(1)と同様の方法で求めた。

#### ③最適基質濃度及び反応時間の検討

これらの条件検討を行う前に、粗酵素液をDEAE-cellulofineイオン交換クロマトグラフィーにより粗精製した。粗酵素液を20mM イミダゾール緩衝液 (pH7.2) で約5倍に希釈し、同じ緩衝液で平衡化したイオン交換クロマトグラフィー (DEAE-cellulofine A-800 : チッソ製 0.75 $\phi$ ×40cm) に注入させ、10℃にてFPLCを用いて分画した。流速は約0.5ml/minで、同じ緩衝液200mlで非吸着画分を溶出した後、0-0.5MのNaCl直線濃度勾配によって吸着画分を溶出させ、試験管に

2mlずつ分取した。これら溶出画分を20mM イミダゾール緩衝液 (pH8.0)、40mM D-S-6-Pバリウム塩、0.33mM NADP、1.67mM CaCl<sub>2</sub>と25℃で30分間反応させ、S6PDH活性のみられた8本分のフラクションを回収し、DEAE活性画分とした。

ブラックマイクロセル内で、20mM イミダゾール緩衝液 (pH8.0)、0.33mM NADP、1.67mM CaCl<sub>2</sub>に、5mM、10mM、20mM、30mM、40mMの5種類のD-S-6-Pバリウム塩をそれぞれ加え、混合して全量1mlとし、25℃で10分間インキュベートした。その後、DEAE活性画分を200 $\mu$ l加えて速やかに攪拌し、25℃で30分間反応させ、分光光度計 (UV-1600、島津製) を用いて2分毎の340nmにおける吸光度の変化を測定した。その変化からNADPの還元量を求め、消費されたS-6-P量 (mM) とし、S6PDH活性とした。

#### (2) 後部絹糸腺S6PDHのグルコース-6-リン酸 (G-6-P) に対する活性測定

前述の③で得たS6PDHのDEAE活性画分を用い、様々な濃度のG-6-Pを基質にして反応を行った。活性測定方法は、石古[12]による方法に従った。すなわちブラックマイクロセル内で、20mM イミダゾール緩衝液 (pH8.0)、0.17mM NADPH、1.67mM CaCl<sub>2</sub>に、20mM、30mM、40mMの3種類のD-G-6-P 1ナトリウム塩 (フナコシ社製) をそれぞれ加え、混合して全量1mlとし、25℃で10分間インキュベートした。その後、DEAE活性画分を200 $\mu$ l加えて速やかに攪拌し、25℃で30分間反応させ、分光光度計を用いて2分毎の340nmにおける吸光度の変化を測定した。その変化からNADPHの酸化量を求め、消費されたG-6-P量 (mM) とし、G-6-Pに対する活性とした。

#### (3) 絹糸腺S6PDH活性測定

上記の2、2で求めた条件下で、5齢起蚕0日目から11日目までの前部・中部・後部絹糸腺から抽出した粗酵素液を用いてS6PDH反応を行い、その活性を測定した。すなわち、20mM イミダゾール緩衝液 (pH8.0)、40mM D-S-6-Pバリウム塩、0.33mM NADP、1.67mM CaCl<sub>2</sub>をマイクロプレート内で混合し、25℃で10分間インキュベートした後、粗酵素液を加えて速やかに攪拌し、10分間反応させた。反応は氷上にて停止させ、S6PDH活

性を2.2(1)と同様の方法で求めた。活性は、1頭当たり及び1分間当たりのS-6-P消費量( $\mu$ moles)として算出した。

### 3. 実験結果

#### 3.1 絹糸腺S6PDH活性測定の方法検討

本章では、絹糸腺におけるS-6-Pの利用について検討するため、S6PDHの活性変動パターンの解析を行った。蚕におけるS6PDHの研究はこれまであまりなされてきていないため、その活性を測定するためには様々な反応条件についてまず検討する必要がある。そこでまず、最適pH、最適温度、最適基質濃度及び反応時間について条件検討を行うことにした。条件検討のためのサンプルとしては、フィブロイン蛋白質の合成が始まる時期の後部絹糸腺を用いるのが適当ではないかと考え、5齢起蚕5日目の後部絹糸腺から抽出した粗酵素液を用いることにした。

##### (1) 最適pHの検討

5齢起蚕5日目の後部絹糸腺から調製した粗酵素液を、イミダゾール、グリシン、トリスの3種類の緩衝液を用い、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0の合計7種類のpHに設定して基質S-6-Pと反応させ、その活性を測定した。反応は30分間行い、1分間当たりのNADP還元量を消費されたS-6-P量(mM)とし、S6PDH活性とした(図1)。

その結果、検出されたS6PDH活性は、 $3.0 \times 10^{-3}$  ~  $4.7 \times 10^{-3}$  mM/minという非常に狭い範囲の値であった。まず、イミダゾール緩衝液においては、pHが高くなるに従って活性も高くなる傾向があった。グリシン緩衝液に関しては、pH9.0で最も高く、pHが高くなると活性は低くなっていた。トリス緩衝液については、pH9.0の方が活性は高く、pH8.0になると低くなっていた。全体的にみて、それ程大きな差はみられなかったが、pH8.0~9.0において最もよく反応しており、以後、pH8.0のイミダゾール緩衝液を用いて反応を行うこととした。

なお同時に、酢酸緩衝液をpH4~6の範囲で、リン酸緩衝液をpH6~8の範囲で、それぞれ用いて検討を行ったが、酢酸緩衝液では酸の影響で

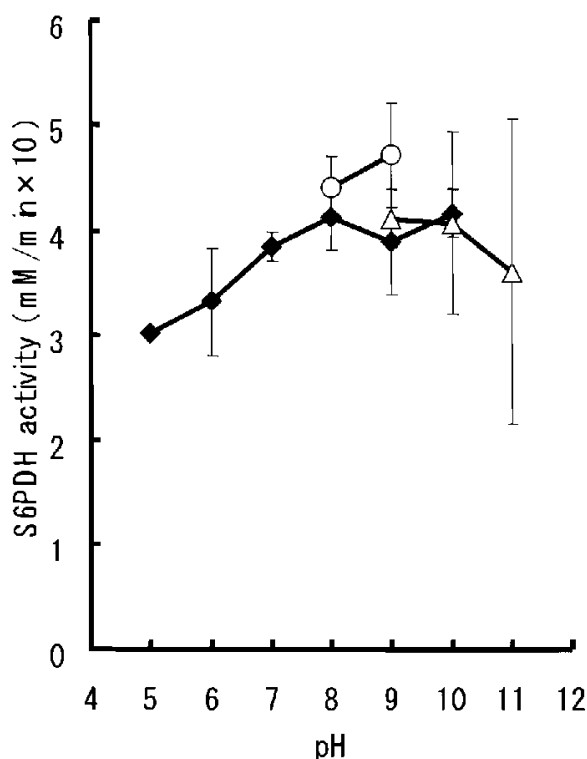


Fig. 1. Effect of pH on S6PDH activity in posterior silk glands. The crude enzyme was prepared from the posterior silk glands of the fifth instar larvae (day 5). The activity of S6PDH was measured in different pHs using the following buffers: 20 mM imidazole buffer (pH 5 - 10), 20 mM glycine-NaOH buffer (pH 9-11) and 20mM M Tris-HCl buffer (pH 8 - 9).

コントロールの値が異常に高くなり、リン酸緩衝液ではリン酸とS-6-Pが何らかの反応を起こして沈殿を作り、いずれも正常にデータを得ることができなかった。

##### (2) 最適温度の検討

5齢起蚕5日目の後部絹糸腺から調製した粗酵素液を、15、25、30、35、40、50、60℃の7種類の温度条件下で基質S-6-Pと反応させ、その活性を測定した。反応は30分間行い、1分間当たりのNADP還元量を消費されたS-6-P量(mM)とし、S6PDH活性とした。その結果、15℃の時にはS6PDH活性は約 $4.3 \times 10^{-3}$  mM/minであったが、温度が上昇するとともに高くなり、60℃では $7.1 \times 10^{-3}$  mM/minとなった(図2)。このように、温度が高くなるにつれてS6PDH活性も上昇する傾向があり、特に最適温度は決定できなかった。本実験では25℃において反応を行うこととした。

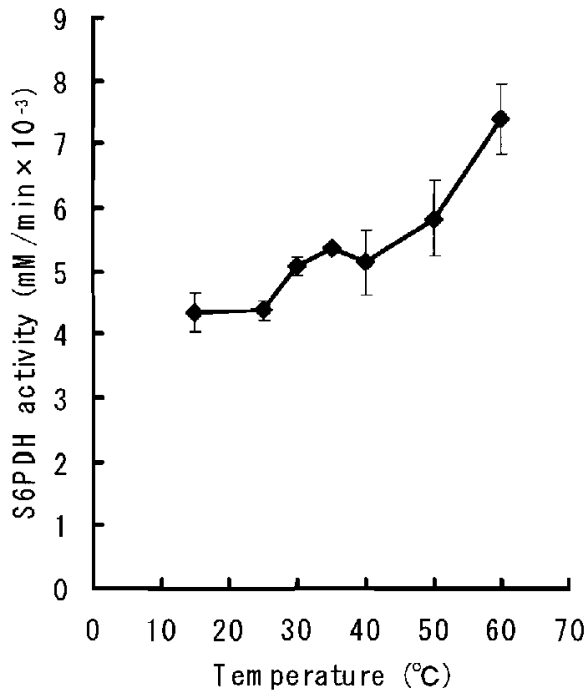


Fig. 2. Effects of temperatures on the activity of S6PDH. The preparation of the enzyme was the same as the methods described in Fig. 1.

### (3) 最適基質濃度及び反応時間の検討

基質濃度及び反応時間の検討については、夾雑物が多く存在すると正確なデータが得られないため、まず粗精製を行う必要があった。5 齢起蚕 5 日目の後部絹糸腺から抽出した粗酵素液を DEAE-cellulofine イオン交換クロマトグラフィーに吸着させ、NaCl の濃度勾配によりその吸着画分を溶出した。その結果、S6PDH 活性はフラクション番号 16~23 においてみられ、この 8 本のフラクション (合計 16ml) を回収して DEAE 活性画分とした (図 3)。この DEAE 活性画分を、5mM、10mM、20mM、30mM、40mM の 5 種類の基質濃度条件下で反応させ、S6PDH 活性を経時的に測定した。その結果、活性は 5mM の基質濃度における場合を除いては濃度依存的に上昇し、最終的には、10mM では 0.03mM、20mM では 0.06mM、30mM では 0.10mM、そして 40mM では 0.15mM (最大値) に達した (図 4)。また、これらの活性上昇パターンは、反応時間 10 分 (間) では直線に乗っていると判断した。そこで、絹糸腺 S6PDH 活性測定は、40mM S-6-P と 10 分間反応させた後行うことに決定した。

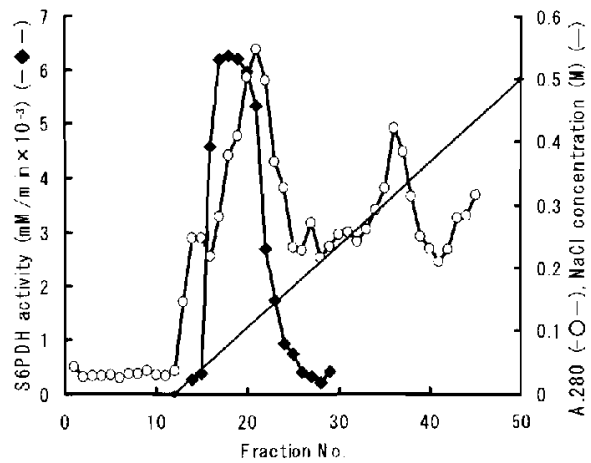


Fig. 3. The chromatogram of S6PDH activity on DEAE-cellulofine. The crude enzyme was prepared from the posterior silk glands of the fifth instar larvae (day 5), and loaded on DEAE-cellulofine equilibrated with 20 mM imidazole buffer (pH 7.2). The elution was undertaken by a linear concentration of 0-0.5 M NaCl, and 2 ml of eluant was collected, and then the activity of S6PDH (●) and the amount of protein (○) were measured.

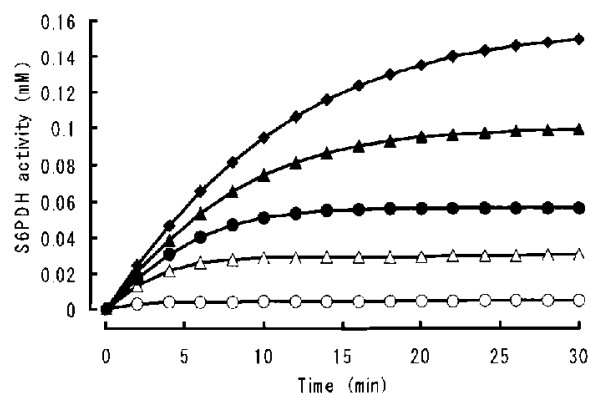


Fig. 4. Effects of substrate sorbitol-6-phosphate on the activity of S6PDH with the proceeding of reaction time. ○- 5 mM S-6-P, △- 10 mM S-6-P, ●- 20 mM S-6-P, ▲- 30 mM S-6-P, ◆- 40 mM S-6-P

また、反応開始 10 分後における S6PDH 活性を基に、横軸に基質濃度の逆数、縦軸に反応速度 (反応生成物濃度) をプロットし、Lineweaver-Burk のプロットを作成した。その結果、 $R^2 = 0.9985$  の直線が得られ、x 軸との交点の値から、本酵素の S-6-P に対する  $K_m$  値は 0.12M と求められた (図 5)。ただし、5mM の S-6-P 濃度の場合には活性がほとんど検出されなかったため、プロット

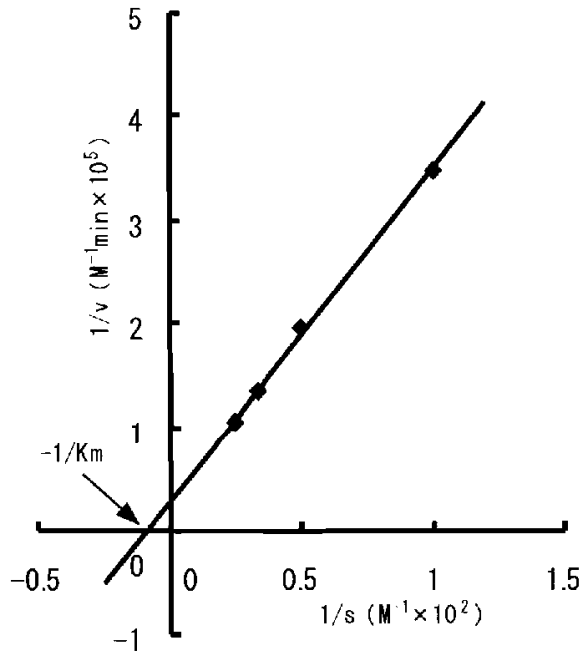


Fig. 5. Line weaver-Burk plots of S6PDH. S : substrate concentration (M), v : Reaction velocity.

トには10mM、20mM、30mM、40mMの4種類の基質濃度に対するS6PDH活性の値を用いた。

### 3. 2 後部絹糸腺S6PDHのグルコース-6-リン酸 (G-6-P) に対する活性

S-6-Pは酸化されてG-6-Pになり、S6PDHはその逆反応も触媒するといわれる[7,12]。そこで、本酵素のG-6-Pに対する活性についても検討するため、DEAE-cellulofineにより粗精製した後部絹糸腺S6PDHを用い、G-6-Pを基質として反応を行った。G-6-Pとの反応は、20mM、30mM、40mMの3種類の濃度のものについて行い、その活性変動は経時的に測定した。その結果、G-6-Pに対する活性は、すべての濃度において反応生成物濃度の直線的な上昇がみられた(図6)。またこれらの直線の傾きは、20mMで0.0001、30mMで0.0004、40mMで0.0006と、濃度依存的に増加していた。30分間反応させた結果、最終的には、20mMで0.004mM、30mMで0.011mM、40mMで0.016mMとなった。

また、基質特異性について検討するためKm値の算出を試みたが、その活性が極めて低いことが原因となり、求めることが出来なかった。

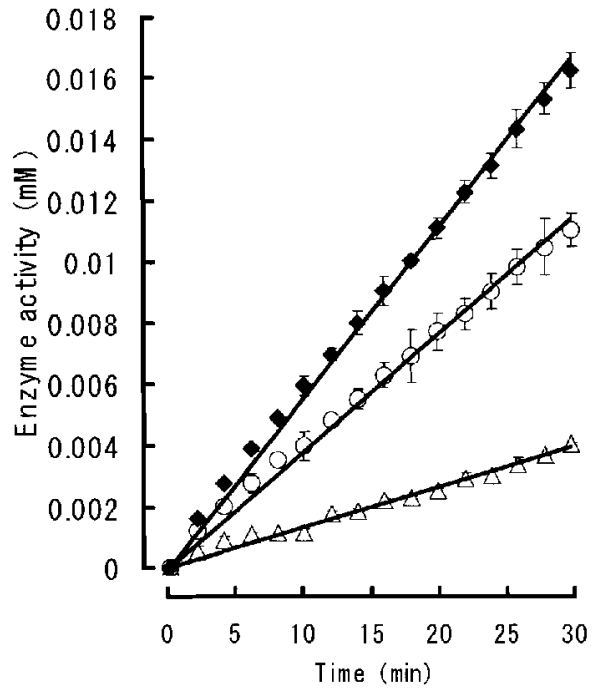


Fig. 6. Enzymatic activity of S6PDH fraction in DEAE column chromatography to G-6-P.  
-△- 20 mM G-6-P, -○- 30 mM G-6-P, -◆- 40 mM G-6-P

### 3. 3 絹糸腺におけるS6PDH活性変動

前部、中部及び後部絹糸腺からそれぞれ粗酵素液を調製し、3. 1で決定した条件下でS-6-Pと反応させてS6PDH活性を測定した。前部絹糸腺については10頭分の組織から、中部及び後部絹糸腺については1頭分の組織から粗酵素液の調製を行い、それぞれ1頭あたりのS6PDH活性として算出した。また、反応は10分間行い、1分間当たりのNADP還元量を消費されたS-6-P量 ( $\mu$  moles) とし、S6PDH活性とした。

#### (1) 前部絹糸腺S6PDH活性変動

トレハラーゼ活性については最も大きな変動をみせた前部絹糸腺において、まずS6PDH活性の変動を検討した。その結果、5齢起蚕時には約0.002  $\mu$  moles/larvaという低い値であり、その後も最大で7日目の0.004  $\mu$  moles/larvaという値に留まり、吐糸終了まで、5齢期を通じて、大きく変動しなかった(図7)。

#### (2) 中部絹糸腺S6PDH活性変動

次に、中部絹糸腺についても前部絹糸腺と同様にS6PDH活性変動を調べた。その結果、中部絹

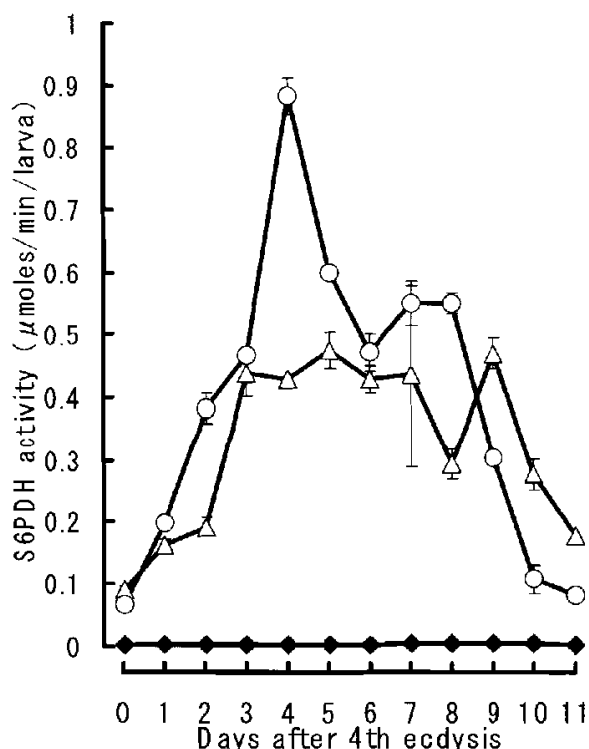


Fig. 7. Fluctuation of S6PDH activity in the anterior, middle and posterior silk glands from the newly ecdysis through day 11 of the fifth instar. The silk glands were taken out from day 0 (newly ecdysis) through day 11 of the fifth instar larva, and then divided into the anterior (◆), middle (△) and posterior (○) parts of the silk glands. These glands were homogenized in 20 mM imidazole buffer (pH 7.2) and used for the estimation of S6PDH activity which was expressed as S-6-P corresponded to reducing equivalent of NADP for one min of the reaction.

糸腺におけるS6PDH活性は、起蚕時には $0.09 \mu$  moles/larva程度であった。しかし、2日目から上昇をみせ、3日目には約 $0.45 \mu$  moles/larvaとなった。その後は、9日目までそのレベルを維持し( $0.45 \mu$  moles/larva)、11日目 ( $0.18 \mu$  moles/larva)に向けて減少した。すなわち、中部糸腺においてS6PDH活性は、5齢期を通じて比較的長い期間検出され続けていた。

### (3) 後部糸腺S6PDH活性変動

後部糸腺においても、同じようにS6PDH活性変動を検討した。その結果、S6PDH活性はやはり起蚕時には約 $0.07 \mu$  moles/larvaと低い値であったが、急激に上昇し、4日目には最大値約 $0.88 \mu$  moles/larvaとなった。これは、中部糸腺で検出

された最大値の2倍近くの値であった。S6PDH活性はその後減少を始め、5日目から8日目にかけて約 $0.50 \sim 0.60 \mu$  moles/larvaのレベルを維持していたが、吐糸終了の11日目には再び $0.08 \mu$  moles/larvaまで減少していた。

### 3. 4 前部、中部および後部糸腺でのトレハラーゼとS6PDHの活性変動の比較

5齢期の糸腺からはトレハラーゼ活性が検出される[2]。このことから、糸腺における体液中トレハロースの利用の可能性が考えられる。このトレハラーゼ活性変動の詳細を前部、中部及び後部糸腺の各部位におけるS6PDHとトレハラーゼの両者の活性変動を比較検討した(図8)。

その結果、前部糸腺では吐糸期にかけて、トレハラーゼ活性のみが上昇し、特に、吐糸1日目に最大となったが、S6PDH活性はほとんど検出されなかった。中部糸腺では、セリシン合成期(起蚕3日目ごろ)から吐糸期(起蚕9日目)にかけて、トレハラーゼ及びS6PDH両酵素活性がゆるやかに上昇した。また、後部糸腺ではフィブリン合成期(起蚕4日目ごろ)にかけて、S6PDH活性のみが上昇し、トレハラーゼ活性はほとんど検出されなかった。

## 4. 考察

トレハロースは昆虫の体液における主要な血糖であり、その恒常性はホルモンの作用によって制御されている[13]。しかし、トレハロースを利用している可能性は前部糸腺においてのみ示唆され(定金ら、2003)、中部糸腺及び後部糸腺における絹蛋白質合成に関わるエネルギーについては、別の代謝経路によって得られていると考えられる。

幼虫の体液には、トレハロースに加えて大量のリン酸化合物が存在することが[14]により明らかになっている。またその大部分が酸可溶性リン酸化合物であることが言われており、それらの中でも特にソルビトール-6-リン酸(S-6-P)が多量に存在するという[1]。さらに、Sakamoto and Horie [7]は5齢期の体液中には多量のS-6-Pと少量のグ



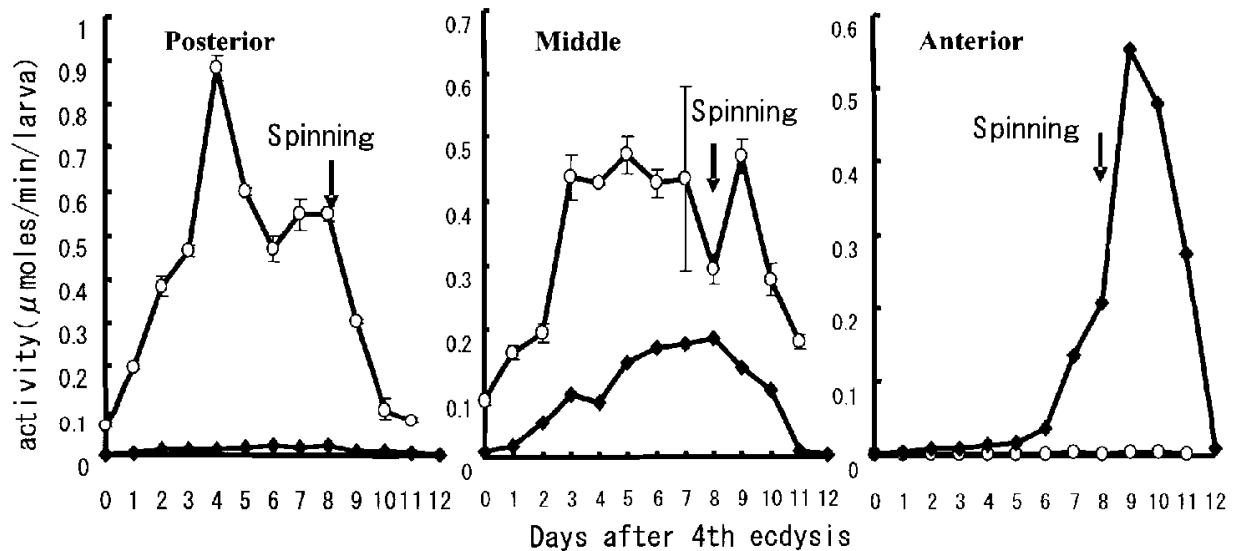


Fig. 8. Comparison of trehalase and S6PDH activities among the anterior, middle and posterior with the development of the silk glands during the fifth instar.  $\blacklozenge$ - trehalase activity,  $\circ$ - S6PDH

ルコース-6-リン酸 (G-6-P) が含まれており、特に前者については、起蚕時にはトレハロースの2倍から3倍という高い濃度で検出されることを示した。しかし、その後S-6-Pは5齢5日目に急激に減少し、翌日6日目にはトレハロースをはるかに下回り痕跡程度になることが明らかとなった[8]。

これまで、蚕においてS-6-Pに関わる酵素としては、5齢幼虫体液中のポリオール-リン酸脱水素酵素として研究が進められてきた。すなわち、蚕の体液にポリオール-リン酸脱水素酵素が存在することが、[15]によって明らかにされ、その後、SakamotoとHorie[11]により、その性質が調べられた。そして、この酵素が、フルクトース-6-リン酸及びリブローズ-5-リン酸に対しては活性が低かったが、グルコース-6-リン酸 (G-6-P) 及びS-6-Pには高い親和性を示し、その $K_m$ 値は、それぞれ、G-6-Pに対しては0.01M、S-6-Pに対しては0.11Mであったということを明らかにした。また、この酵素は、これらすべての基質に対してNADではなくNADP要求性の酵素であるという。

一方、Asakuraら[9]によると、後部絹糸腺を*in vitro*で培養し、その培地にS-6-Pを添加すると、フィブリン蛋白質の合成が促進するという。従って、後部絹糸腺ではS-6-Pをエネルギー源として

利用している可能性が示唆される。そこで、絹糸腺におけるエネルギー供給について考察する際に、S-6-Pの代謝について検討する必要があるのではないかと考えた。すなわち、前部絹糸腺では体液中トレハロースを分解しエネルギーとすると推察されるが、後部絹糸腺ではトレハロースではなくS-6-Pがエネルギー源として利用されるという。

そこで、S-6-Pに関わる酵素、S6PDHが蚕の絹糸腺に存在している可能性について検討するため、絹糸腺から抽出した粗酵素液について、S-6-Pを基質とし、NADPを補酵素として酵素反応を行い、NADPの還元量からS6PDH活性を求め、絹糸腺におけるその活性変動パターンについて調べることにした。まず、先にも記したように、昆虫におけるS6PDHについてその反応様式などは詳細に調べられてきていないため、反応条件の検討を行う必要がある。今回、最適pH、最適温度、最適基質濃度及び反応時間について検討した。

(1) 最適pH: イミダゾール、グリシン、トリスの3種類の緩衝液を用い、pH 5~11の範囲で検討を行った。それ程目立って大きな差はみられず、pH 8~10付近でわずかに高い活性が確認された(図1)。以後は、pH 8.0のイミダゾール緩衝液を用いて実験を行うこととした。なお、これらに加え、酢酸緩衝液をpH 4~6の範囲で、リン

酸緩衝液をpH 6～8の範囲で、それぞれ用いて検討を行ったが、酢酸緩衝液では酸の影響でコントロールの値が異常に高くなり、リン酸緩衝液ではリン酸とS-6-Pが何らかの反応を起こして沈殿を作り、いずれも正常に反応を行うことができず、これらはS6PDH反応の緩衝液として適していないと判断した。

(2) 最適温度：次に、15～60℃の範囲の7点の温度条件下でS6PDH反応を行い、最適温度の検討を行った。その結果、特に最適温度というのは確認されず、温度が高くなるに従い活性も高くなる傾向にあるということが分かった(図2)。酵素反応は、温度が高ければ高い程良いというわけではなく、酵素の安定性を考えると25℃が最適であろうと考えた。そこで、以後は、25℃下で反応を行うこととした。

(3) 最適基質濃度：最適基質濃度を検討するためには、供雑物を除いた比較的純度の高いものをサンプルとして用いる必要があると考えた。そこで、5齢5日目の後部絹糸腺から抽出した粗酵素液を、DEAE-cellulofineイオン交換クロマトグラフィーによって分画した。その溶出画分のS6PDH活性を測定したところ、フラクション番号16から23にかけて活性が検出された(図3)ため、この8本分をDEAE活性画分とし、最適基質濃度の検討に用いた。5 mMから40 mMまでのS-6-P濃度に対しその酸化量の経時的変動をみたところ、5 mMのものについてはほとんど変化がみられなかった。しかし、10 mMから40 mMのものについては、濃度依存的に活性が高くなっているのが確認された(図4)。そこで、より直線的な活性の上昇がみられた、40 mMのものを以下の実験で用いることとした。

(4) 反応時間：上記の実験にて、特に20 mM以上の酵素濃度のものについて、反応開始から約10分後まで、勾配が直線上に乗っていると判断した(図4)ので、以下の実験では、反応時間は10分を行うこととした。

ところで、蚕体液中に存在するポリオールリン酸脱水素酵素は、

$S-6-P + NADP^+ \rightleftharpoons G-6-P + NADPH + H^+$   
の両方の反応を触媒する[11,12]と言われており、

今回粗精製したS6PDHについても、S-6-PだけでなくG-6-Pとも反応させ、その活性について検討する必要があると考えた。右から左への反応については、NADPHを補酵素として加え、その酸化量から酵素活性を求め、時間の経過に伴う活性変動パターンを得た。その結果、時間経過に対する生成物濃度のプロットからは、G-6-Pを生成する反応では、勾配が次第に低下する曲線が得られたのに対し、S-6-Pを生成する反応では、勾配は直線となった。さらに、反応30分後の生成物濃度を比較すると、G-6-Pを生成する反応に比べて、S-6-Pを生成する反応は約1/10となっており、本酵素は特にS-6-PをG-6-Pに変換する反応をよく触媒することが推察される。

また、基質特異性について検討するため、S-6-P及びG-6-Pの両基質に対する $K_m$ 値の算出を試みた。その結果、S-6-Pについては、 $R^2=0.9985$ のLineweaver-Burkの直線が得られ、 $K_m$ 値は約0.12 Mと求められた。この濃度は、今回の実験で用いた40 mMよりはるかに高い値であり、さらに高い基質濃度下での検討が必要であることがうかがえた。しかし、それほどの濃度のS-6-Pを蒸留水に溶解することは困難であり、また今回の40 mM S-6-P条件下においても十分な吸光度の上昇がみられたため、これ以上の基質濃度の検討は必要ないと思われる。一方、G-6-Pに対する反応であるが、S-6-Pのときと同じ40 mMの濃度であっても、その活性は極めて低く、 $K_m$ 値の算出が不可能であった。しかし、経時的変化のグラフ(図4と5)からも明らかであるように、本酵素S6PDHは、S-6-Pを基質とした時の方が、活発な活性をみせることが明らかとなった。

SakamotoとHorie[11]によって求められた体液ポリオールリン酸脱水素酵素のS-6-Pに対する $K_m$ 値は0.11 Mであり、今回求めた絹糸腺S6PDHの0.12 Mとは非常に近い値であると言える。5齢期の体液中S-6-P濃度は0.02 M前後であり[8,11]、これらの $K_m$ 値は体液中S-6-P濃度に比べて5～6倍となっている。このことは、本酵素の活性が体液中S-6-P濃度に依存していることを示している。

反応条件を上記の(1)～(3)のように決定し、前部、中部及び後部絹糸腺それぞれについて、

S6PDH活性測定を行い、その変動を調べた。その結果、後部及び中部絹糸腺において活性の変動が確認された(図7)。トレハラーゼ活性の高かった前部絹糸腺については、S6PDH活性は非常に低い値に留まっていた。中部絹糸腺においては、特に最大値はみられず、5齢3日目から9日目まで高いレベルを維持していた。中部絹糸腺では5齢3日目ごろから組織が大きく肥大を始め、同時にセリシン蛋白質が合成され始める。そして後部絹糸腺から送られてくるフィブロイン蛋白質とともに、吐糸が始まるまでそこに蓄えられるため、組織は吐糸が開始する直後まで肥大成長を続ける。中部絹糸腺におけるS6PDH活性変動パターンは、この部位における蛋白質の合成及び貯蓄に関与していることを示唆している。また、後部絹糸腺においては、S6PDH活性は4日目に最も高くなった。これは、Odaら[8]による体液中S-6-P濃度の変化と平行な結果である言え、フィブロイン蛋白質の合成のために、体液中のS-6-Pを後部絹糸腺がエネルギー源として利用していることを示唆するものであると考えられる。

前部絹糸腺は、絹蛋白質の合成を行わず、液状絹を吐糸管へと送る導管の役割を担っており、また、液状絹のゲル→ゾル変換にも関わっていると考えられる。本研究で、前部絹糸腺において、中部及び後部に比べて非常に高いトレハラーゼ活性が検出され、またその活性上昇が蛋白質の *de novo* 合成によるものであるということが明らかになったことで、前部絹糸腺が吐糸に際して非常に重要な役割を担っていることが考えられた。しかもその活性上昇パターンからみて、吐糸1日目に最もエネルギーを必要とするようである。現在、前部絹糸腺の機能については明確になっていないが、酸性化に寄与するためのイオンポンプへのエネルギー供給に関与している可能性も考えられる[16]。

中部絹糸腺では、5齢3日目ごろから組織が大きく肥大を始め、同時にセリシン蛋白質が合成され始める。そして後部絹糸腺から送られてくるフィブロイン蛋白質とともに、吐糸が始まるまでそこに蓄えられるため、組織は吐糸が開始する直後まで肥大成長を続ける。今回明らかになった、中部

絹糸腺におけるS6PDH活性変動パターン及び、最初に示したトレハラーゼ活性変動パターンは、この部位における蛋白質の合成及び貯蔵という、一連の働きにS-6-P及びトレハロースが関与していることを示唆している。

後部絹糸腺においては、トレハラーゼ活性は検出されず、S6PDH活性のみが4日目に最も高くなった。これは、Odaら[8]及びAsakuraら[9]の推察を支持するものとなっており、フィブロイン蛋白質の合成のために、体液中のS-6-Pを後部絹糸腺がエネルギー源として利用していることを示唆するものであると考えられる。中部絹糸腺においてもトレハラーゼ活性よりもS6PDH活性の方が高かったことから、絹蛋白質合成のためにはトレハロースよりもS-6-Pをエネルギー源として使う傾向があるのではないかと推察される。

以上のように、絹糸腺において、前部・中部・後部それぞれの部位で行われる異なる仕事のために、体液中に存在する異なる炭水化物が利用されるという、炭水化物の代謝面における機能分化が起こっているということが考察された。これまで、エネルギー供給や代謝に関する研究は、絹糸腺全体をひとくくりとして捉えて行われてきた。しかし、今回このような機能分化が起こっている可能性が示唆されたことは、絹糸腺の研究及び昆虫における炭水化物代謝の面で、大きな成果であると考えている。

今後は、S6PDHに関してより詳細に研究を行う必要があり、DEAE-cellulofineのみならず完全に精製を行って抗体及びプローブを作製し、今回のトレハラーゼのように、蛋白質の変動や組織内での局在、また遺伝子発現の面からもアプローチを行わねばならないと考えている。

## 5. 謝辞

本実験を遂行するにあたり、ご助言賜った本学応用生物学科・長岡純治博士、供試蚕の飼育にご協力頂いた島袋順二技官に心より感謝の意を表します。

## 引用文献

- [1] Wyatt, G.R. (1967) : The biochemistry of sugars and polysaccharide in insects. *Adv. Insect Physiol.* 4, 287-360
- [2] Shimada, S. (1975) : Trehalase activity in the silk glands of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae). *Can. Ent.* 107, 1311-1314
- [3] Shimada, S. (1976) : Transition of properties in the silk Gland trehalase during metamorphosis of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.* 54B, 47-50
- [4] Shimada, S., and Kamada, A. (1980) : Effect of methoprene on trehalose content and trehalase activity in the silk glands of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae). *Appl. Ent. Zool.* 15(3), 270-274
- [5] Furusawa, T., Wakizaka, T., and Ishihara, Y. (1993) : Effect of an imidazole compound, KK-42, on changes in trehalose content and trehalase activity in the silk glands of the silkworm, *Bombyx mori* Lepidoptera : Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 26, 169-176
- [6] 定金恵子・古澤壽治・黄色俊逸・林 幸之 (2003) : カイコ絹糸腺における炭水化物代謝に関する研究—前部絹糸腺におけるトレハラーゼ活性変動とmRNAの発現— *衣笠織研報* 7, 19-27.
- [7] Sakamoto, E., and Horie, Y. (1979) : Quantitative change of phosphorus compounds in hemolymph during development of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Sericult. Sci. Japan.* 48(4), 319-326
- [8] Oda, Y., Iwami, M., Osanai, M., and Sakurai, S. (1997) : Dynamics of haemolymph sorbitol-6-phosphate and its control by ecdysteroid in the larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 27(5), 461-468
- [9] Asakura, T., Yamada, H., Demura, M. and Osanai, M. (1990) :  $^{13}\text{C}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR analyses of the cultured posterior silk Gland of the silkworm, *Bombyx mori* : Silk fibroin production and the effect of sorbitol-6-phosphate. *Insect Biochem.* 20, 261-266
- [10] Somogyi, M. (1952) : Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195, 19-23
- [11] Sakamoto, E., and Horie, Y. (1980) : Polyol phosphate dehydrogenase in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci. Japan.* 50(3), 197-205
- [12] 石古 秀平 (2001) : カイコ5齢期の体液、後部絹糸腺におけるソルビトール-6-リン酸代謝に関わる酵素活性の変動 *京都工芸繊維大学 卒業論文*
- [13] Saito, S. (1963) : Trehalose in the body fluid of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Insect. Physiol.* 9, 509-519
- [14] Tsuji, C. (1909) : Studies on the blood of silkworms. *Sanshi Hokoku.* 35, 1-24
- [15] Faulkner, P. (1956) : Enzymic reduction of sugar phosphates in insect blood. *Biochem. J.* 64, 436-441
- [16] Azuma, M., and Ohta Y. (1998) : Changes in  $\text{H}^+$ -translocation vacuolar-type ATPase in the anterior silk gland cell of *Bombyx mori* during metamorphosis. *J. Exp. Biol.* 201, 479-486

# トランスジェニックカイコを用いた 抗菌タンパク質遺伝子転写因子のノックダウン

山本真史\*・山尾真史\*・森山悠子\*・松木浩之\*・森 肇\*<sup>1</sup>・

林 幸之\*\*・田中博光\*\*・山川 稔\*\*\*

## Knockdown of Transcriptional Factor of Anti-bacterial Protein by using Transgenic Silkworm

Masafumi YAMAMOTO, Masafumi YAMAO, Yuko MORIYAMA,  
Hiroyuki MATSUKI, Hajime MORI, Yoshiyuki HAYASHI,  
Hiromitsu TANAKA and Minoru YAMAKAWA

\*Insect Biomedical Center, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

\*\*Kinugasa Textile Research Institute, The Kinugasa-kai Foundation, 29  
Shimohakubai-cho, Kitano, Kita-ku, Kyoto 603-8326, Japan

\*\*\*National Institute of Agrobiological Sciences, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan

### Abstract

Recently knockdown technique by RNA interference (RNAi) is widely used to analyze gene regulation in many species of *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, etc. Our new method for silkworm transformation by using a baculovirus *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus and a transposable element *piggyBac* was applied to knockdown of a transcriptional factor of antibacterial peptide. *BmRel* is considered to be a transcriptional factor of silkworm antibacterial peptide genes. Transgenic silkworms with *BmRel* knockdown were prepared by this novel method to analyze the effects of the *BmRel* gene on the transcription of antibacterial peptide genes *in vivo*. The *BmRel*-knockdown transgenic pupae were injected with *Micrococcus luteus* and *Escherichia coli*. Then, transcription of silkworm antibacterial peptide genes was analyzed by real-time PCR and compared with that of normal silkworms injected with the same bacteria. The *BmRel* gene expression was suppressed significantly in transgenic silkworm against the injection with gram-positive bacteria *M. luteus*. The rates of antibacterial peptide gene expression under these conditions were also suppressed, suggesting that the *BmRel* gene plays an important role *in vivo* in the activation of antibacterial peptide genes upon infection with *M. luteus*. However, the down regulation of expression of *BmRel* gene and silkworm antibacterial peptide genes was not observed against the injection with gram-negative bacteria *E. coli*. These results suggested that *BmRel* gene was involved in the activation of antibacterial peptide genes against gram-positive bacterial invading.

### 1. 緒言

昆虫でのRNAiはショウジョウバエではよく研究されているが[1-4]、これまでにカイコでのそういった結果の報告は皆無であった。ショウジョウバエにおいてのRNAiは当初dsRNAをインジェ

クションすることによって行われていたが、この場合、胚でのみしか現象は認められずRNAiの効果が短いという欠点があった。そこで持続的なRNAiを観察するにはdsRNAを体内で発現させるためにトランスジェニックラインを確立する必要があった。カイコにおいても同様であると考えら

\* 1 連絡先：京都工芸繊維大学昆虫バイオメディカルセンター、606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町  
E-mail : hmori@ipc.kit.ac.jp, TEL 075-274-7776, FAX 075-724-7776

れ、dsRNAを発現する個体を作製し、これをライン化しなければならない。我々が確立した形質転換法は非常に簡便で高効率にトランスジェニックカイコを得ることができる。そこで本研究ではカイコ個体における内在性遺伝子のRNAiによるノックダウン実験の可能性について検討した。

今回RNAiを行ったのは、昆虫の抗菌タンパク質発現に対して先天性免疫応答する抗菌タンパク質遺伝子の転写調節因子で[5]、Rel様領域(RHD)と転写活性化領域を持つタンパク質であるRelタンパク質としてカイコで単離されたBmRel遺伝子のノックダウンを行った。この実験によりカイコの抗菌タンパク質遺伝子の発現調節機構をカイコ個体を用いて解析することが可能となり、カイコの体内に進入した微生物に対する先天性免疫システムを解明することができると期待される。

## 2. 材料及び方法

### 2. 1 トランスファーベクター

#### pVLpigEGFPRel構築と精製

カイコアクチンA3プロモーターを含むプラスミドpA3LacZを鋳型にして制限酵素EcoT221サイトを付加したプライマー

A3Eco:

5'-AAAAATGCATTGATAGCGTGCGGTTACCA-3'

制限酵素PstIサイトを付加したプライマー

A3RPstI:

5'-AAAAGTGCAGGAATGCGCACTGTTTCGAGCA-3'

を用いて、94℃ 15秒、55℃ 30秒、68℃ 60秒の反応を30回繰り返すPCR反応によりA3プロモーター領域を増幅した。PCRのポリメラーゼにはKOD-Plus-を用い、増幅されたPCR産物はQIAquick PCR Purification Kitを用いて精製した後エタノール沈殿を行った。沈殿はTE緩衝液(10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA)に溶解した。さらに制限酵素EcoT221とPstIで処理を行いフェノール抽出・エタノール沈殿を行った後1%アガロースゲルで電気泳動を行い約180bpの目的断片を含むゲルを切り出した。ゲルからのDNA断片はQIAquick Gel Extraction Kitを用いて抽出し、エタノール

沈殿後TE緩衝液に溶解した。次に、トランスファーベクターpVLpigA3EGFPも同様に制限酵素EcoT221とPstIで処理を行った後、フェノール抽出・エタノール沈殿を行いTE緩衝液に溶解した。さらに、末端を脱リン酸化するためにBAP処理を37℃で1時間行った。反応後、等量のフェノールで抽出し、さらにジエチルエーテルによる抽出を3回行った。そしてエタノール沈殿によってDNAを回収しTE緩衝液に溶解した。このプラスミドとA3プロモーターのPCR産物を混合し、DNA Ligation Kit ver.2を用いてライゲーションを行った。ライゲーション後JM109 Competent Cellsへ形質転換を行った。形質転換した大腸菌は2×TYプレートに蒔き37℃で一晩培養した。そして、コロニーを形成した大腸菌を拾って1.5 mlの2×TY培地で16時間振とう培養した。培養後、遠心によって集菌し、Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systemを用いてプラスミドDNA pVLpigEGFPA3を抽出した。続いて、カイコRel (BmRel) 遺伝子のcDNAがクローニングされたプラスミドpBS/BmRel (Tanaka *et al.*, under submission) を鋳型にして制限酵素BgIIIサイトを付加したプライマー

RelBgI2:

5'-AAAAAGATCTATGGACATCGCGGAGACGC-3'

制限酵素PstIサイトを付加したプライマー

RelPstI-3:

5'-AAAAGTGCAGGCTCTGCGTGTGCGAGCGGT-3'

を用いて、94℃ 15秒、55℃ 30秒、68℃ 60秒の反応を30回繰り返すPCR反応により、BmRel領域の一部を増幅した。PCRのポリメラーゼにはKOD-Plus-を用い、増幅されたPCR産物はQIAquick PCR Purification Kitを用いて精製した後エタノール沈殿を行った。沈殿はTE緩衝液に溶解した。さらに制限酵素BgIIIとPstIで処理を行いフェノール抽出・エタノール沈殿を行った後1%アガロースゲルで電気泳動を行い約600bpの目的断片を含むゲルを切り出した。ゲルからのDNA断片はQIAquick Gel Extraction Kitを用いて抽出し、エタノール沈殿後TE緩衝液に溶解した。さらにプラスミドpVLpigEGFPA3も同様に制限酵素BgIIIとPstIで処理を行った後、フェノール抽出・エ



タノール沈殿を行いTE緩衝液に溶解した。さらに、末端を脱リン酸化するためにBAP処理を37℃で1時間行った。反応後、等量のフェノールで抽出し、さらにジエチルエーテルによる抽出を3回行った。そしてエタノール沈殿によってDNAを回収した。回収したDNAはTE緩衝液に溶解した。このプラスミドとBmRelのPCR産物を混合し、DNA Ligation Kit ver.2を用いてライゲーションを行った。ライゲーション後JM109 Competent Cellsへ形質転換を行った。形質転換した大腸菌は2×TYプレートに蒔き37℃で一晩培養した。そして、コロニーを形成した大腸菌を拾って1.5 mlの2×TY培地で16時間振とう培養した。培養後、遠心によって集菌し、Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systemを用いてプラスミドDNA pVLpigEGFPA3Rを抽出した。

さらに、プラスミドpEGFP-N3を鋳型にして制限酵素BgIIIサイトを付加したプライマーSV40Bgl2-1:

5'-AAAAAGATCTTCATAATCAGCCATACCACA-3'  
SV40Bgl-2:

5'-AAAAAGATCTCACAACACTAGAATGCAGTGAA-3'  
を用いて、94℃ 15秒、55℃ 30秒、68℃ 60秒の反応を30回繰り返すPCR反応により、SV40ポリA付加シグナルを増幅した。PCRのポリメラーゼにはKOD-Plus-を用い、増幅されたPCR産物はQIA quick PCR Purification Kitを用いて精製した後エタノール沈殿を行った。沈殿はTE緩衝液に溶解した。さらに制限酵素BgIIIで処理を行いフェノール抽出・エタノール沈殿を行った後1%アガロースゲルで電気泳動を行い約700bpの目的断片を含むゲルを切り出した。ゲルからのDNA断片はQIA quick Gel Extraction Kitを用いて抽出し、エタノール沈殿後TE緩衝液に溶解した。さらにプラスミドpVLpigEGFPA3Rも同様に制限酵素BgIIIで処理を行った後、フェノール抽出・エタノール沈殿を行いTE緩衝液に溶解した。さらに、末端を脱リン酸化するためにBAP処理を37℃で1時間行った。反応後、等量のフェノールで抽出し、さらにジエチルエーテルによる抽出を3回行った。そしてエタノール沈殿によってDNAを回収しTE緩衝液に溶解した。このプラスミドとSV40 polyA付加シ

グナルのPCR産物を混合し、DNA Ligation Kit ver.2を用いてライゲーションを行った。ライゲーション後JM109 Competent Cellsへ形質転換を行った。形質転換した大腸菌は2×TYプレートに蒔き37℃で一晩培養した。そして、コロニーを形成した大腸菌を拾って1.5mlの2×TY培地で16時間振とう培養した。培養後、遠心によって集菌し、Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systemを用いてプラスミドを抽出し、制限酵素処理によりインサートの方向を確認後プラスミドDNA pVLpigEGFPA3RSVを抽出した。続いて、プラスミドpBS/BmRelを鋳型にして制限酵素PstIサイトを付加したプライマー

RelPstI-1:

5'-AAAACACTGCAGATGGACATCGGCTTAGACGC-3'

RelPstI-2:

5'-AAAACACTGCAGCGTAGATGATGTCGGACACG-3'

を用いて、94℃ 15秒、55℃ 30秒、68℃ 60秒の反応を30回繰り返すPCR反応により、BmRel領域の一部を増幅した。PCRのポリメラーゼにはKOD-Plus-を用い、増幅されたPCR産物はQIA quick PCR Purification Kitを用いて精製した後エタノール沈殿を行った。沈殿はTE緩衝液に溶解した。さらに制限酵素PstIで処理を行いフェノール抽出・エタノール沈殿を行った後1%アガロースゲルで電気泳動を行い約700bpの目的断片を含むゲルを切り出した。ゲルからのDNA断片はQIA quick Gel Extraction Kitを用いて抽出し、エタノール沈殿後TE緩衝液に溶解した。さらにプラスミドpVLpigEGFPA3RSVも同様に制限酵素PstIで処理を行った後、フェノール抽出・エタノール沈殿を行いTE緩衝液に溶解した。さらに、末端を脱リン酸化するためにBAP処理を37℃で1時間行った。反応後、等量のフェノールで抽出し、さらにジエチルエーテルによる抽出を3回行った。そしてエタノール沈殿によってDNAを回収した。回収したDNAはTE緩衝液に溶解した。このプラスミドとBmRelのPCR産物を混合し、DNA Ligation Kit ver.2を用いてライゲーションを行った。ライゲーション後JM109 Competent Cellsへ形質転換を行った。形質転換した大腸菌は2×TYプレートに蒔き37℃で一晩培養した。そしてコロニーを

形成した大腸菌を拾って1.5mlの2×TY培地で16時間振とう培養した。培養後、遠心によって集菌し、Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systemを用い、制限酵素処理によりインサートの方向を確認してプラスミドDNA pVLpigEGFPA3Relを抽出した。

## 2. 2 リコンビナントウイルス

### AcpigEGFPA3Relの作製

トランスファーベクターpVLpigEGFPA3Rel 5 µgと線状化されたAcNPV (C6) 由来のBaculogold™ Baculovirus DNA 0.5 µgをファルコンチューブ (15ml) で混合し、滅菌水で26 µlに調整した。ここに、Lipofectin Reagentを14 µl加え、室温で15分間静置した。35mmシャーレにSf21細胞を吸着させ無血清のGrace培地で洗浄し、新たに無血清のGrace培地を2 ml加えた後、ファルコンチューブで混合した40 µlをSf21細胞に接種した。27℃で24時間培養し、血清を含むGrace培地に交換した後再び27℃で培養した。5日後、培養液を回収し、1,000rpm、5分間の遠心で細胞を沈殿させ、この上清ウイルス液をブランク純化の際の試料とした。まず、35mmシャーレにSf21細胞を $1 \times 10^6$  cells/dishになるように蒔き吸着させた。そして、培養液を除き、ウイルスを適度に希釈したものを200 µl接種し27℃で1時間、ウイルスを細胞に感染させた。1時間後に接種液を取り除き42℃で保温した寒天培地を2 ml加えた。この寒天培地は蒸留水で3%に溶かし滅菌した低融点アガロースを培養液で1%にしたものを用いた。重層した寒天培地が固まった後さらに1 mlの培養液を重層し、27℃で5日間培養した。5日後、形成されたブランクをパスツールピペットで寒天ごと回収し、1 mlの培養液中に浮遊させた。これを接種液としてSf21細胞に接種し、27℃で5日間培養した後、培養液上清を1,000rpm、5分間の遠心で回収し、リコンビナントウイルスAcpigEGFPA3Rel (Fig. 1) を得た。

## 2. 3 カイコ卵へのリコンビナントウイルスの接種

産下直後のカイコ非休眠卵にウイルス液 (40%

AcpigEGFPA3Rel, 40% AcpigHspTrans, 20% Glycerol) を棒鏝で先端を研磨したタングステン針の先端に付け、実態顕微鏡下で卵にインジェクションした。インジェクションした卵は、シャーレ内に湿らせた脱脂綿と共に25℃、暗条件で孵化2日前まで保管した。孵化する2日前にクリーンベンチ内で卵の消毒を行い、孵化したG0世代の幼虫は4齢起蚕まで29℃で人工飼料育を行った。

## 2. 4 トランスジェニックカイコのスクリーニング

すでに報告した方法[6]に従いG0世代の4齢幼虫に長波長の紫外線を照射し、EGFPの緑色蛍光が観察されたものを選抜し、飼育を続けた。

## 2. 5 PCR法によるトランスジェニックカイコのスクリーニング

選抜したカイコG1世代の卵よりゲノムを抽出し、PCRの鋳型として用いた。BmRel遺伝子はカイコ自身が持っているためにEGFPのプライマーを用い、同じ操作をすることによってトランスジェニックカイコのスクリーニングを行った。

## 2. 6 カイコへの菌体の接種

BmRelノックダウンカイコにおける抗微生物タンパク質の発現を見るためにグラム陽性菌である*Micrococcus luteus* (NBRC3333, 製品評価技術基盤機構) とグラム陰性菌である*Escherichia coli* (NBRC3001, 製品評価技術基盤機構) の2種類の菌体をカイコに接種した。

*Micrococcus luteus* 乾燥菌体を液体培地 (10g Bacto Polypepton, 2g Bacto Yeast extract, 1g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O/L$ ) に加え、菌体液をプレート培地 (10g Bacto Polypepton, 2g Bacto Yeast extract, 1g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 15g Agar/L) に蒔き30℃で48時間培養した。そして、形成したコロニーを拾って3 mlの液体培地で30℃、48時間振とう培養した。この培養液を10 µlを3 mlの液体培地に移し、菌体が対数増殖期に達する $OD_{600} = 0.7 \sim 0.9$ になるまで30℃で振とう培養を行った。対数増殖期に達した培養液を15,000 rpm、5分の遠心により集菌し、上清を取り除いた後500 µlのPBSで2回

洗浄してから500  $\mu$ lのPBSに懸濁し、117°Cで20分間高圧蒸気滅菌してこれを菌体液とした。

続いて、*Escherichia coli*乾燥菌体を液体培地に加え、菌体液をプレート培地に蒔き30°Cで24時間培養した。そして、形成したコロニーを拾って3 mlの液体培地で30°C、24時間振とう培養した。この培養液を10  $\mu$ lを3 mlの液体培地に移し、菌体に対数増殖期に達するOD600=0.7~0.9になるまで30°Cで振とう培養を行った。対数増殖期に達した培養液を15,000 rpm、5分の遠心により集菌し、上清を取り除いた後500  $\mu$ lのPBSで2回洗浄してから500  $\mu$ lのPBSに懸濁し、117°Cで20分間高圧蒸気滅菌してこれを菌体液とした。

この2種類の菌体液を吐糸開始7日目のBmRelノックダウンカイクおよびコントロールのカイクにそれぞれ50  $\mu$ l接種した。

## 2. 7 カイク脂肪体からのトータルRNA抽出

菌体液を接種してから2時間後の蛹を解剖し、脂肪体約170mgを1.5mlチューブに採取し、以下SV Total RNA Isolation System (Promega社製)を用いてトータルRNAを抽出した。操作はキットのプロトコールに従った。

## 2. 8 トータルRNAからのcDNAの合成

抽出した全RNAの濃度を吸光度計で測定し、その2.5  $\mu$ gを鋳型にFirst-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham社製)を用いてオリゴdTプライマーでcDNA合成を行った。操作はキットのプロトコールに従った。

## 2. 9 RT-PCRによる発現量の測定

RP-PCRによって発現量を調べた遺伝子は、BmRel、Attacin (S78369)、CecropinA (D17394)、CecropinB (D11113)、Moricin (AB006915)、Lebocin1&2 (AB003036)、Lebocin3 (AB003035)、Lebocin4 (AB019538) および内部コントロールとしてカイクの30kタンパク30k19G1 (X54736)である。( )内にジーンバンクデータベースによるアクセッションナンバーを示す。PCRは以下のプライマーを用いて行った。なおLebocinの1と2では遺伝子間の相同性が高く、PCRによる特定

が不可能なため1と2を同じプライマーで測定した。

BmRel用プライマー

Forward 5'-AATGACCCCAATCAACCTAAGG-3'

Reverse 5'-ATTGACTCGCCATGTTCTCTAAGG-3'

Attacin用プライマー

Forward 5'-GCTCGCTCTAGACAACGTAAACG-3'

Reverse 5'-CTCAGGTCGTGGTTGTTATTGIG-3'

CecropinA用プライマー

Forward 5'-CCGTCATAGGGCAAGCGAAATCC-3'

Reverse 5'-CGGTCCTCTGAGAAAGGCAATGAC-3'

CecropinB用プライマー

Forward 5'-GTACAGCGCCGCTTGTGTCTTAAC-3'

Reverse 5'-CTTTAGCCGAACCAAGGACCTCG-3'

Moricin用プライマー

Forward 5'-GGCAATGTCTCTGGTGTTCATGTAG-3'

Reverse 5'-CTGGCGATATTGATGGCTCTTAG-3'

Lebocin1&2用プライマー

Forward 5'-GCGGCCGCTCAACATGTACAAG-3'

Reverse 5'-CAGTACTTGGCGCACGAGGAAC-3'

Lebocin3用プライマー

Forward 5'-CTCGGTGGAAATCATCCCTTTGCC-3'

Reverse 5'-CTCCAGGTACATTGCAGTGTACTAG-3'

Lebocin4用プライマー

Forward 5'-GGCAGTGAATCCGTCATTCCTAACC-3'

Reverse 5'-CTACAATGCTAACGGACTCGCGC-3'

30k protein用プライマー

Forward 5'-GAAGTCCCGAACATTACGCTTGG-3'

Reverse 5'-TGCTCATTCTCATTGGTTCGTGG-3'

反応にはSYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (Perfect Real Time) (TaKaRa社製)を用い、20  $\mu$ Mの各遺伝子に対するプライマー、そして1  $\mu$ lの鋳型cDNA (20ng)と滅菌蒸留水で調節した。以下に反応液組成を示す。SYBR PremixExTaq<sup>™</sup> 12.5  $\mu$ l, ROX Reference Dye 0.5  $\mu$ l, Forward Primer (20  $\mu$ M) 0.25  $\mu$ l, Reverse Primer (20  $\mu$ M) 0.25  $\mu$ l, 滅菌蒸留水10.5  $\mu$ l, 鋳型cDNA 1.0  $\mu$ lで合計25.0  $\mu$ l。反応にはABI PRISM<sup>®</sup> 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems社製)を用いて行った。反応は95°Cで10秒間加熱した後、95°Cで5秒間、60°Cで31秒間の温度周期を40回行った。発現量の解析はABI PRISM 7000 SDS

Software (Applied Biosystems 社製) にて行った。

### 3. 結果

#### 3.1 リコンビナントウイルス AcpigEGFPA3Relの作製

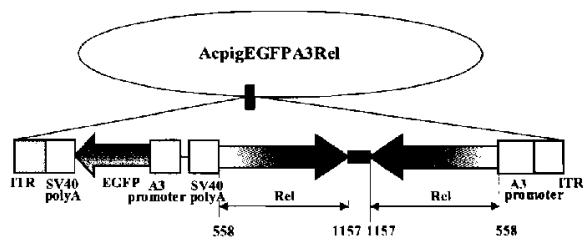


Fig. 1 Vector virus for *BmRel* gene knockdown silkworm. ITR, inverted terminal repeat of a transposable element *piggyBac*; SV40 poly A, poly A additional signal sequence from SV40; A3, silkworm actin A3 promoter; EGFP, green fluorescence protein.

トランスジェニックカイコを用いたカイコでのノックダウンを試みた。特にカイコ生体内で *BmRel* 遺伝子の mRNA の一部をコードする RNA のヘアピン構造によって RNAi による同遺伝子の発現制御を行った。RNAi を行うための組換えウイルス *AcpigEGFPA3Rel* (Fig.1) は *BmRel* 遺伝子の開始コドンである 558 番目の塩基配列から 1157 番目までの 600bp と、そこから 1260 番目の塩基配列から 558 番目までの逆配列が A3 プロモーターにより転写される。1158 番目の塩基配列から 1260 番目までの約 100bp がヘアピン構造で介在された配列が、*BmRel* 遺伝子の mRNA の一部が二本鎖となる RNA が転写されることになる。この配列をもつリコンビナントウイルスを作製しトランスジェニックカイコを作製した。これによって RNAi による *BmRel* 遺伝子の mRNA が特異的に分解されるものと期待される。

#### 3.2 卵へのウイルスのインジェクション およびトランスジェニックカイコの スクリーニング

リコンビナントウイルス *AcpigEGFPA3Rel* と *AcpigHSPTrans* を混合したウイルス液のインジェクションを 2 つの実験区に分け孵化した幼虫の飼育を行い、孵化率の算出を行ったところ孵化率は実験区 1 では 52.0%、実験区 2 では 62.0% であった。さらに 4 齢起蚕時に EGFP が緑色蛍光発する 490nm の励起波長を照射し、緑色蛍光を示す個体のスクリーニングを行い、EGFP 遺伝子を持つと考えられる割合を算出したところ、その割合は実験区 1 で 4.1%、実験区 2 では 4.2% であった。これらのトランスジェニック個体については成虫まで飼育を行い、羽化後正常なカイコと交配させ  $G_1$  を得た。得られた  $G_1$  卵約 100 個より孵化直前にゲノムを抽出し、EGFP 遺伝子を標的に PCR によって増幅させることで、EGFP 遺伝子がカイコの染色体上に導入されているかを確認した。遺伝子導入が確認できたトランスジェニックラインについて飼育を行い、4 齢期に EGFP の緑色蛍光でスクリーニングを行った結果、EGFP をマーカーとして *BmRel* の dsRNA を発現する配列が  $G_1$  世代にまで伝達されたと期待される個体が選抜された (Table 1)。

Table 1 Isolation of *Rel* gene knockdown silkworm and its efficiency

Experiments	No. of injected eggs	No. of hatched larvae	No. of fluorescent $G_0$ larvae	No. of EGFP positive $G_1$ broods	No. of fluorescent $G_1$ larvae
1	325	169 (52.0%)	7 (4.1%)	4 (57.1%)	15/153 (9.6%)
					21/329 (6.4%)
2	412	257 (62.0%)	11 (4.2%)	9 (81.8%)	39/267 (14.6%)
					20/134 (14.9%)
					14/148 (9.4%)
					9/61 (14.7%)

#### 3.3 蛹への菌体の接種による

##### 各抗菌タンパク質の発現解析

*BmRel* 遺伝子ノックダウンカイコ及びコントロー

ルのカイコについて蛹期に *Micrococcus luteus* と *Escherichia coli* の2種類の菌体をカイコに接種し、2時間後に脂肪体からトータルRNAを抽出した。オリゴdTによってcDNAを合成した後、リアルタイムRT-PCRによってBmRelならびに抗菌タンパク質Attacin、CecropinA、CecropinB、Moricin、Lebocin1&2、Lebocin3、Lebocin4そして内部コントロールとしてカイコの30kタンパク質の遺伝子レベルでの発現量を測定した。その結果、*Micrococcus luteus*投与区においてBmRel遺伝子ノックダウンカイコについてはコントロールのカイコに比べてBmRel遺伝子のリアルタイムRT-PCRによる増幅が遅く、BmRel遺伝子の転写量が抑制されていることがわかった (Fig. 2)。すなわち、BmRel遺伝子ノックダウンカイコが得られたと結論付けられた。次に、このBmRel遺伝子ノックダウンカイコにおけるAttacin、CecropinA、CecropinB、Moricin、Lebocin1&2、Lebocin3、Lebocin4のすべての抗菌タンパク質遺伝子の転写量の変化について調べた。その結果、特にAttacin、Moricin、Lebocin1&2、Lebocin3、Lebocin4の転写量は顕著に低下しており、またCecropinA、CecropinBについてはコントロールのカイコよりもその転写量は低下していることがわかった (Fig.2-5)。また内在性コントロール30kタンパク質については、ノックダウンカイコとコントロールカイコでは遺伝子の転写量に差は見られなかった (Fig. 6)。

一方、*Escherichia coli*投与区においてはMoricin、Lebocin4遺伝子の転写量がわずかに低下しており、BmRel、Attacin、CecropinA、CecropinB、Lebocin1&2、Lebocin3遺伝子の転写量はほとんど差が認められなかった (Fig. 7,8)。また、30kタンパク質については、遺伝子の転写量に差は見られなかった (Fig. 9)。これらと比較してみるとBmRelノックダウンカイコはグラム陽性菌である *Micrococcus luteus* の刺激に対してBmRel及び一連の抗菌タンパク質の転写量が減少しているが、グラム陰性菌である *Escherichia coli* の刺激に対してはBmRelや各抗菌タンパク質の転写量には全く影響を及ぼさないという結果が得られた (Table 2)。

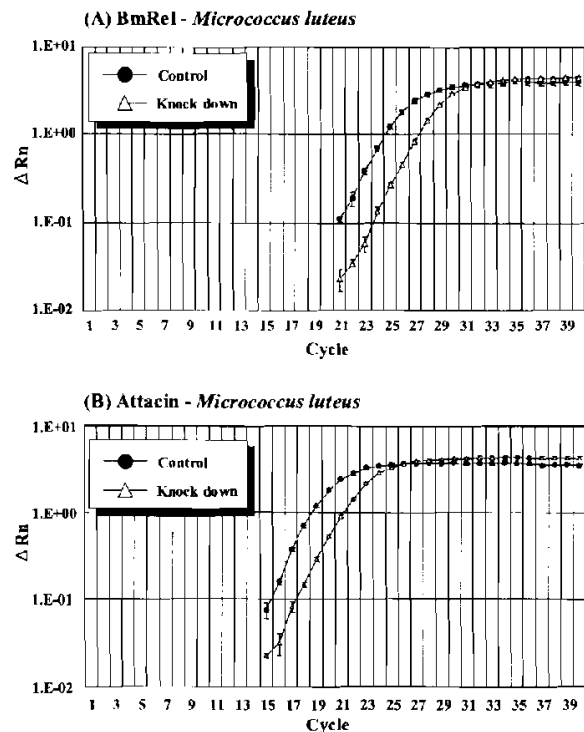


Fig. 2 Analyses of BmRel (A) and attacin (B) gene expression by real time RT-PCR in *BmRel* gene knockdown pupae inoculated with *Micrococcus luteus*.

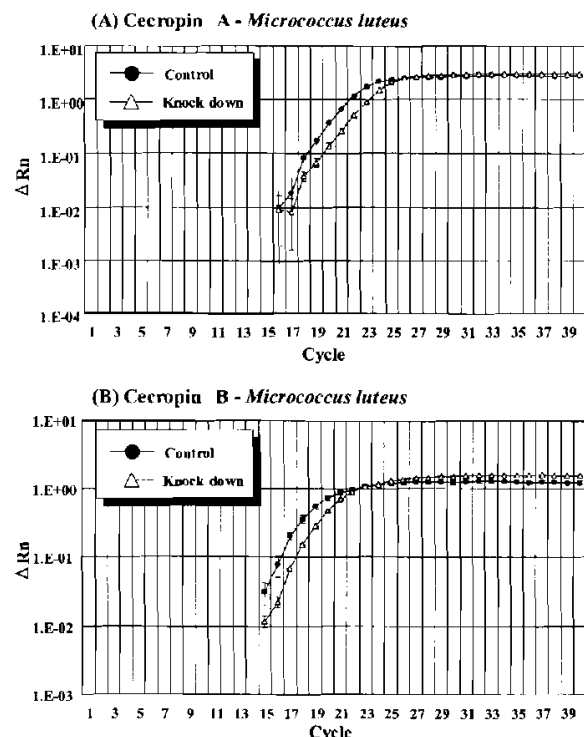


Fig. 3 Analyses of cecropin A (A) and cecropin B (B) gene expression by real time RT-PCR in *BmRel* gene knockdown pupae inoculated with *Micrococcus luteus*.

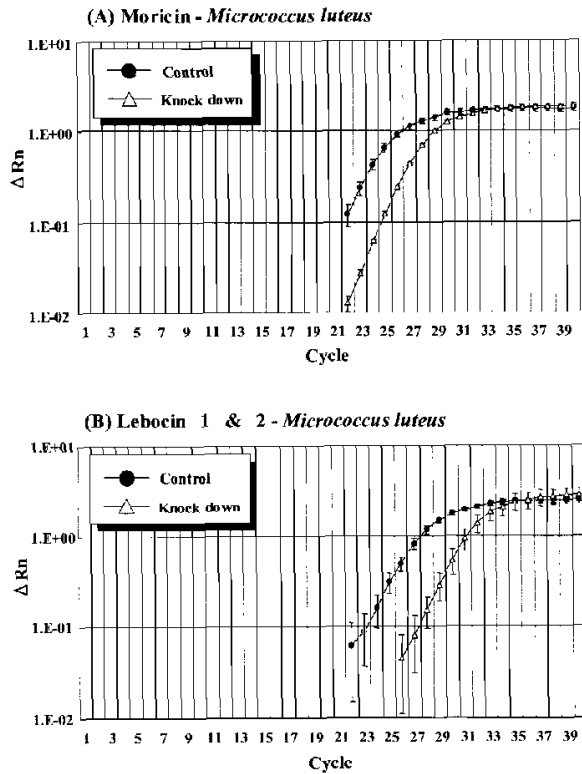


Fig. 4 Analyses of moricin (A) and lebecin 1 & 2 (B) gene expression by real time RT-PCR in *BmRel* gene knockdown pupae inoculated with *Micrococcus luteus*.

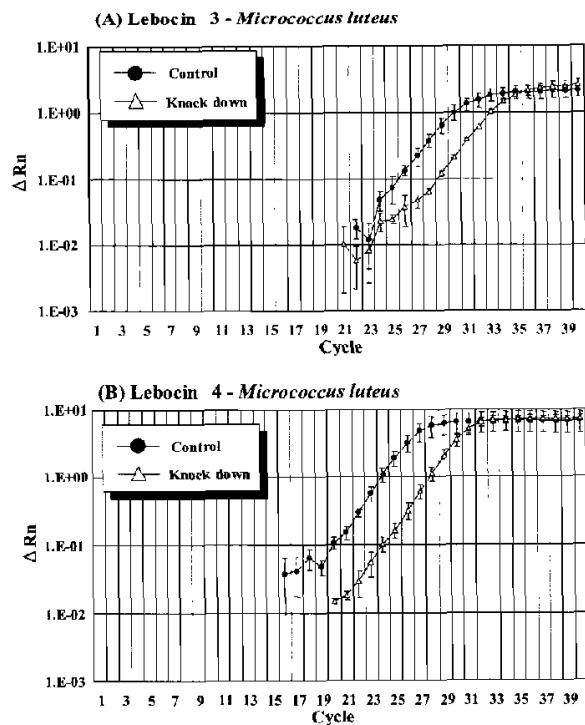


Fig. 5 Analyses of lebecin 3 (A) and lebecin 4 (B) gene expression by real time RT-PCR in *BmRel* gene knockdown pupae inoculated with *Micrococcus luteus*.

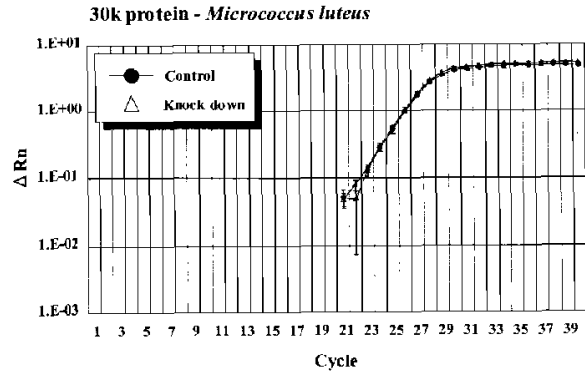


Fig. 6 Analyses of 30k gene (internal standard) expression by real time RT-PCR in *BmRel* gene knockdown pupae inoculated with *Micrococcus luteus*.

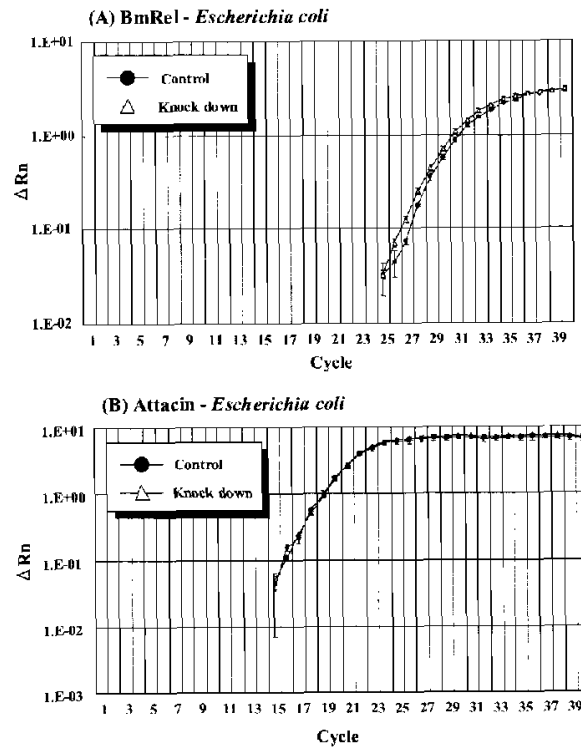


Fig. 7 Analyses of *BmRel* (A) and attacin (B) gene expression by real time RT-PCR in *BmRel* gene knockdown pupae inoculated with *Escherichia coli*.

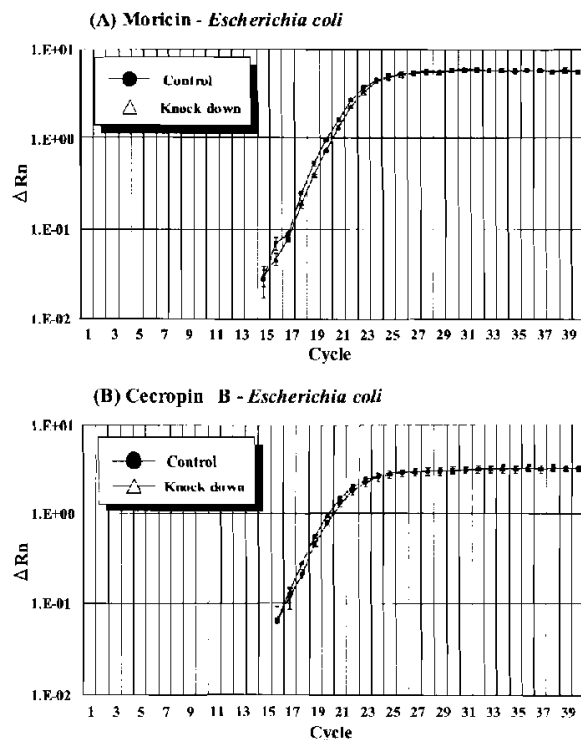


Fig. 8 Analyses of moricin (A) and cecropin B (B) gene expression by real time RT-PCR in *BmRel* gene knockdown pupae inoculated with *Escherichia coli*.

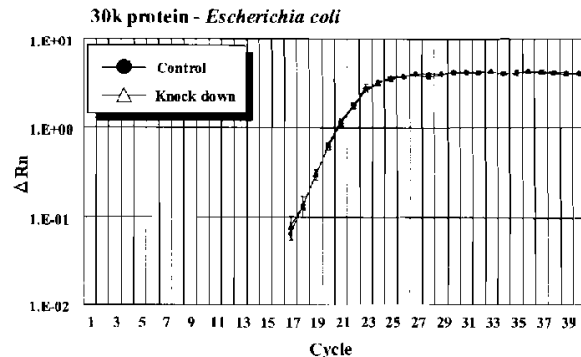


Fig. 9 Analyses of 30k gene (internal standard) expression by real time RT-PCR in *BmRel* gene knockdown pupae inoculated with *Escherichia coli*.

Table 2 Result of real time RT-PCR in *Rel* gene knock-down silkworm

	<i>Micrococcus luteus</i> 投与	<i>Escherichia coli</i> 投与
BmRel	+++	±
Attacin	++	±
CecropinA	++	±
CecropinB	++	±
Moricin	+++	+
Lebocin1&2	+++	±
Lebocin3	+++	±
Lebocin4	+++	+

転写量の抑制レベル +++ < 80%, ++ < 60%, + < 40%, ± < 10%

#### 4. 考察

これまでの植物やショウジョウバエの細胞を用いたdsRNAの導入によるRNAiについては、dsRNAを形成している部分の長さが、400~500bpは必要とされており、300bp以下ではその効果がかなり低くなるということが報告されている[7]。またdsRNAは目的遺伝子の開始点近傍を含んでいると起こりやすいといわれている。さらに、長鎖のdsRNAでインターフェロンの応答誘導系を活性化するため、脊椎動物ではRNAiを引き起こさせることが困難とされてきた[8]。しかし最近siRNAの導入により可能となり、このsiRNAの設計においても厳密な原則が見つけられていないものの、一部では対象となる遺伝子の翻訳開始点からわずかな下流領域を作製することで効果が得られる場合が多いといわれている。本章の実験では100bpの介在配列を設け、600bpの*BmRel*遺伝子に対するdsRNAが発現するようにトランスファーベクターを構築した。本章で作製した*BmRel*ノックダウンカイコとコントロールカイコの*BmRel*のmRNAの転写量をリアルタイムRT-PCRによって測定したが、リアルタイムRT-PCRの増幅曲線に対するThreshold Cycle (Ct) から比較Ct法によりそれぞれの遺伝子に対する転写量としてcDNAの初期濃度を算出した。このcDNAの初期濃度をノックダウンカイコとコントロールカイコで比較することで、各遺伝子の転写量がどれだけ抑制された



のかを算出した結果、BmRelにおいて82.1%転写量が抑えられていた。このことから、ノックダウンカイコではBmRelに対するdsRNAが発現しsiRNAへの分解が行われていた、つまりカイコ個体内でRNAiが行われていたといえる。

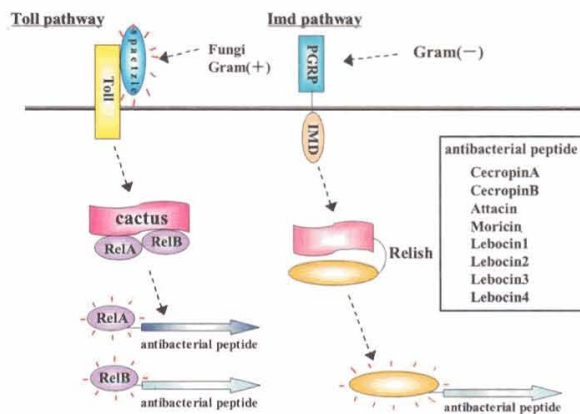


Fig. 10 Toll and Imd pathway for insect immune system.

昆虫の抗菌タンパク質は現在までに200種類近く単離され、そのアミノ酸配列が明らかにされてきている[9-12]。カイコから単離された抗菌タンパク質Attacin、CecropinA、CecropinB、Moricin、Lebocin1、Lebocin2、Lebocin3、Lebocin4のcDNAがクローニングされている。これらの遺伝子の特徴として、類似のものが複数個存在しファミリーを形成していることが挙げられる[13-15]。また抗菌タンパク質の遺伝子発現制御部位にはTATAボックス、CAATボックスの上流にリポポリサッカライド(LPS)応答配列あるいはRel/NF- $\kappa$ Bファミリー結合部位が必ず見られることとインターロイキンのIL-6応答配列の存在が特徴的である。Rel/NF- $\kappa$ Bとは哺乳類のシグナル伝達において抗菌タンパク質の発現に直接作用する転写調節因子NF- $\kappa$ Bの中で、Rel様領域(RHD)と転写活性化領域を持つRelタンパク質である。例えばシヨウジョウバエの脂肪体で合成される抗菌タンパク質は、細菌や微生物の細胞成分を膜貫通型受容体Tollによって認識し、最終的に細胞中の3種類のRHDを持ったRelタンパク質(Dorsal, Dif, Relish)が核に移行し、抗菌タンパク質遺伝子の5'上流配列に存在するRel/NF- $\kappa$ Bファミリー結合部位に結合

して抗菌タンパク質遺伝子の発現を促進する[16-18]。カイコにおいて単離されたBmRelはRHDを持った遺伝子である。この伝達機構は、哺乳類のサイトカインによるNF- $\kappa$ B依存性急性期応答遺伝子誘導と相同であり、自然免疫が進化のごく初期の段階から備わったものとして考えられている[5]。通常、Relタンパク質は真菌やグラム陽性菌の感染時に働くTollの経路の一部を担っているのではないかと推察されていたが[13]、その詳細については明らかにされていなかった。Toll経路に存在するRelは抗菌タンパク質遺伝子に直接シグナルを送る最後の因子であるRel/NF- $\kappa$ Bファミリーに属し、通常はアンキリンリピートをもったCactusという抑制因子と結合して活性化しないようになっている(Fig. 10)。しかし、微生物に対するシグナルが来てCactusが分解されるとRelはそれ自身が自由になることにより活性化され、抗菌タンパク質遺伝子の転写を誘導する。今回作製したBmRelノックダウンカイコならびにコントロールのカイコにグラム陽性菌である*Micrococcus luteus*を投与し、抽出したトータルRNAからBmRel遺伝子と各抗菌タンパク質の転写量をリアルタイムRT-PCRにおいて解析した結果、BmRelノックダウンカイコではコントロールと比べてAttacin、CecropinA、CecropinB、Moricin、Lebocin1&2、Lebocin3、Lebocin4の転写量が強く抑制されていた。一方で、グラム陰性菌である*Escherichia coli*の場合ではBmRelノックダウンカイコとコントロールを比較してみても、各抗菌タンパク質遺伝子の転写量の変化はほとんど見られなかった。まだこれらの抗菌タンパク質がどのような経路を経て発現するのかの全容は明らかにされていないが、BmRelノックダウンカイコではグラム陽性菌である*Micrococcus luteus*の投与に対してすべての抗菌タンパク質の発現が抑制され、グラム陰性菌である*Escherichia coli*では変化がみられないことから、BmRelはグラム陽性菌に対する免疫系であるToll経路と強い関わりがあることを明確に証明することができた。さらにBmRelノックダウンカイコに*Micrococcus luteus*と*Escherichia coli*を投与した場合、*Micrococcus luteus*に対するBmRelの転写量の抑制が*Escherichia coli*の場合と比べて極めて大き

いことがわかった。これについては以下のように考察した。*Escherichia coli*の刺激ではBmRelの転写誘導はほとんど生じていないと考えられた。なぜならFig. 3とFig. 4を比較すると、*Escherichia coli*の投与によるBmRelノックダウンカイコとコントロールカイコでのBmRel遺伝子の転写量が著しく低いことがわかる。これは前述の通りRelタンパク質はCactusと呼ばれる抑制因子と結合することで自身の活性を抑えられた状態で細胞質中に留まり、Relタンパク質自身の発現量も穏やかな状態である。つまり*Escherichia coli*の刺激に対してBmRelの発現に変化は見られず、その発現量は非常に低いレベルであったものと考えられた。このことからBmRelはグラム陽性菌である*Micrococcus luteus*の刺激によりその発現量が誘導され、さらにグラム陽性菌に対して抗菌タンパク質遺伝子の転写を促進するものと考えられた。

本研究でのBmRel遺伝子のノックダウンにより、カイコの先天性免疫誘導にかかわるsignal transductionが解明できると共に、RNAiによって遺伝子レベルでカイコのタンパク質発現メカニズムを明らかにすることができると考えられる。本研究ではカイコ内存在性遺伝子のRNAiとしてカイコ抗菌タンパク質転写調節因子であるBmRelのノックダウンを行い、BmRelはToll経路と強い関わりがあることが証明できたが、カイコ個体レベルで抗菌タンパク質発現抑制を観察し、発現調節機構を明らかにするためにはBmRel遺伝子だけでは不完全かもしれない。BmRelの抑制因子として考えられているBmCactusやグラム陰性菌に対して抗菌タンパク質の発現調整を行っていると考えられるImd経路におけるRel/NF- $\kappa$ Bファミリー因子であるBmRelishの遺伝子をRNAiによってノックダウンを行うことによって、様々な微生物刺激に対する抗菌タンパク質の発現量の解析、Table現系の変化などを調査する必要があるといえる[13]。そのためにも、本研究で確立した簡便かつ高効率にトランスジェニック個体が得られる方法で、RNAiによるノックダウンが行えたことは、カイコの生体内における遺伝子機能を網羅的かつ高効率に解析することができる有力なツールを提供できたと考えられる。

## References

- [1] Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G.J. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404 : 293-296
- [2] Ui-Tei, K., Zenno, S., Miyata, and Y., Singo, K. 2000. Sensitive assay of RNA interference in *Drosophila* and Chinese hamster cultured cells using firefly luciferase gene as target. *FEBS Lett.* 479 : 79-82
- [3] Misquitta, L., and Paterson, B.M. 1999. Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i) : a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 : 1451-1456
- [4] Kennerdell, J.R., and Carthew, R.W. 1998. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 95 : 1017-1026
- [5] Dushay, M.S., Asling, B., and Hultmark, D. 1996. Origins of immunity : Relish, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 : 10343-10347
- [6] Yamamoto, M., Yamao, M., Nishiyama, H., Sugihara, S., Nagaoka, S., Tomita, M., Yoshizato, K., Tamura, T., and H. Mori. 2004. A new and highly efficient method for the silkworm transgenesis using *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus and *piggyBac* transposable elements. *Biotechnol. Bioeng.* 88 : 849-853
- [7] Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15 : 188-200
- [8] Bernstein E, Denli AM, and Hannon GJ. The rest is silence. 2001. *RNA.* 7 : 1509-21.

- [9] Boman, H.G., Faye, I., gudmundsson, G.H., Lee, J.Y., and Lidholm, D.A. 1991. Cell-free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins. *Eur. J. Biochem.* 201 : 23-31
- [10] Dushay, M.S., and Eldon, E.D. 1998. *Drosophila* immune responses as models for human immunity. *Am. J. Hum. Genet.* 62 : 10-14
- [11] Hultmark D. 1993. Immune reactions in *Drosophila* and other insects : a model for innate immunity. *Trends Genet.* 9 : 178-83.
- [12] Ip, Y.T., Reach, M., Engstrom, Y., Kadalayil, L., Cai, H., Gonzales-Crespo, S., Tatei, K., and Levine, M. 1993. Dif, a dorsal-related gene that mediates an immune response in *Drosophila*. *Cell* 75 : 753-763
- [13] Imamura, M., and Yamakawa, M. 2002. Molecular cloning and expression of a Toll receptor gene homologue from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1576 : 246-254
- [14] Kappler, C., Meister, M., Lagueux, M., Gateff, E., Hoffmann, J. A., and Reichhart, J. M. 1993. Insect immunity. Two 17 bp repeats nesting a kappa B-related sequence confer inducibility to the dipterecin gene and bind a polypeptide in bacteria-challenged *Drosophila*. *EMBO J.* 12 : 1561-1568
- [15] Kobayashi, A., Matsui, M., Kubo, T., and Natori, S. 1993. Purification and characterization of a 59-kilodalton protein that specifically binds to NF-kappa B-binding motifs of the defense protein genes of *Sarcophaga peregrina* (the flesh fly). *Mol. Cell. Biol.* 13 : 4049-4056
- [16] Silverman, N., Zhou, J., Stöven, S., Pandey, N., Hultmark, D., and Maniatis, T. 2000. A *Drosophila* IkappaB kinase complex required for Relish cleavage and antibacterial immunity. *Genes Dev.* 14 : 2461-2471
- [17] Sun, S. C., and Faye, I. 1992. *Cecropia* immunoresponsive factor, an insect immunoresponsive factor with DNA-binding properties similar to nuclear-factor kappa B. *Eur. J. Biochem.* 204 : 885-892
- [18] Vidal, S., Khush, R. S., Leulier, F., Tzou, P., Nakamura, M., and Lemaitre, B. 2001. Mutations in the *Drosophila* dTAK1 gene reveal a conserved function for MAPKKKs in the control of rel/NF-kappaB-dependent innate immune responses. *Genes Dev.* 15 : 1900-1912

# 繊維集合体への透湿に対する数値シミュレーション

西村太良\*

## Numerical Simulation of Moisture Transmission through a Fiber Assembly

Taro NISHIMURA\*

*\*Design Engineering and Management, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology,  
Sakyo-ku Kyoto, 606-8585*

### Abstract

In this paper we attempted to simulate numerically the moisture transmission phenomena in a fiber assembly. The moisture distribution was calculated with the help of a two-dimensional model, which was consisted by two rectangle areas occupied by fiber material and by air space. Then the changes of moisture concentration distribution with time and of the absorption rate from the air space into fiber material are discussed under the condition of various diffusion constants of fiber material and the model dimension.

Transient phenomena of moisture transmission with time are clarified under the different diffusion constant of fiber material. In the air space, the slope of the curve of the mean concentration change with time is initially steeper for smaller diffusion constant of the fiber material than for larger diffusion constant. With increasing time, the tendency becomes contrary, and the curves intersect each other.

Effects of the ratio of model thickness to width on the moisture transmission are also discussed in this paper. For narrower model the time required to attain to equilibrium value of concentration is longer because of narrow air space entrance. With increasing model width the time becomes short quickly. But for further wider model, the time required increases again a little because of larger entrance area of fiber.

**Key Words :** Moisture transmission, Fiber assembly, Numerical simulation, Transient phenomena

## 1. まえがき

繊維集合体中の透湿特性に関する詳細な検討は、衣服の材料の向上を改良するためには重要な検討課題である。これまでも多くの研究者が繊維集合体中への透湿挙動を扱ってきている。実験的には蒸気カップ方法を用いた多くの研究がある。金網[2]の報告は透湿の定常状態の測定になっており、衣服の快適性に関する説明をするにはまだまだ不十分である。

過渡現象に対してもいくつかの報告がある。丹羽[4]はカップ法を用いて、種々の材料の異なっ

た布について透湿初期の測定を行っている。しかし、材料の違いによる透湿初期の挙動の違いを議論していない。J.A.Wehtnerら[5]は布への吸湿と湿気の布中の透過を過渡期間に同時測定し、それらの過程の相互作用を議論している。Kimら[3]は人が着た状態をモデル化して、2層にした布の蒸気圧と両表面の温度の動的な変化を測定し、異なった繊維材料での快適性を検討している。さらに、過渡現象に関する数値シミュレーションとしては、J.A.Wehtnerら[5]は吸湿と蒸気移動の相互作用をモデル化し、数値モデルによって解析した。そのモデルは、空気領域と繊維材料領域の双方に

\*連絡先：京都工芸繊維大学繊維学部デザイン経営工学科、606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町、  
E-Mail：taro@kit.jp、TEL&FAX 075-724-7560

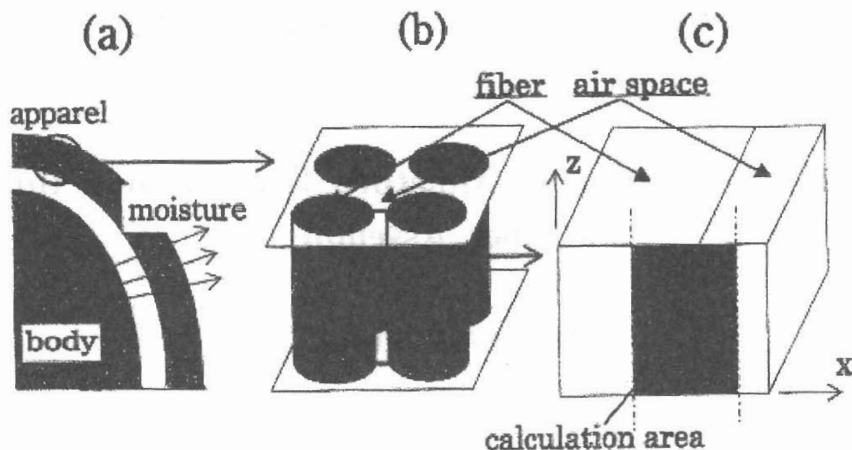


Fig. 1 Schematic diagram of the model development : (a) apparel covering a body, (b) three-dimensional model of apparel, (c) two-dimensional model by use of square pillar.

吸湿するとして、繊維集合体の空隙率をパラメータとしては一次元に単純化して定式化している。福田ら[1]は透湿挙動を説明するために吸湿制御拡散モデルを提案し、ポリエステルやキュプラとポリエステル混織布の実験結果と比較している。しかしこのモデルも一次元モデルである。

本報告では、繊維材料領域と空気領域が長方形で構成されている2次元モデルを用い、繊維集合体中の蒸気分布の時間変化を数値的にシミュレーションして検討した。

## 2. 計算方法

### 2.1 計算モデルの構築

図1にモデル構築の概略図を示す。身体から蒸気が衣料を通して外気に抜けることを想定し(a)、衣料部分の繊維を(b)に示すように身体に垂直な円柱として近似し、さらに3次元計算の複雑さを避けるために、(c)に示すように繊維材料の円柱を角柱に置き換えた。繊維と繊維の間の空気領域も角柱になる。この場合には、2次元の濃度の矩形部分を計算することによって角柱の3次元領域がシミュレーションできることになる。

ここでは、拡散方程式を使ってこのように2次元にモデル化した繊維集合体領域を通過する蒸気の移動を数値計算した。構成式は無次元化して用いた。無次元パラメータは次式に上付き\*で示す。

$$C(t)^* = C(t)/C_{ac}, \quad x^* = x/z_i, \quad z^* = z/z_i, \quad W^* = W/z_i, \\ T^* = z_i/W$$

$$D_f^* = D_f/D_a, \quad D_a^* = D_a/D_a = 1, \quad t^* = t(D_a/z_i^2) \\ \text{ここで}$$

- $C(t)$  :  $t$ 時間における蒸気濃度
- $C_{ac}$  : 空気領域中の臨界蒸気濃度
- $x, z$  : 計算位置を示す座標
- $z_i$  : モデルの厚さ
- $W$  : モデルの幅
- $D_f$  : 繊維材料中での拡散係数
- $D_a$  : 空気中での拡散係数
- $t$  : 時間

蒸気濃度分布の時間変化は次に示す拡散方程式に支配される。空気領域中での拡散方程式を(1)式に示す。

$$\frac{\partial C^*}{\partial t^*} = D_a^* \left( \frac{\partial^2 C^*}{\partial x^{*2}} + \frac{\partial^2 C^*}{\partial z^{*2}} \right) \quad (1)$$

繊維材料中では(2)式となる

$$\frac{\partial C^*}{\partial t^*} = D_f^* \left( \frac{\partial^2 C^*}{\partial x^{*2}} + \frac{\partial^2 C^*}{\partial z^{*2}} \right) \quad (2)$$

境界条件を図2に示す。

繊維材料領域と空気領域の中心線上では濃度勾配はゼロであるから、次式となる。

$$\frac{\partial C^*}{\partial x^*} = 0$$

繊維材料領域と空気領域の境界線上の繊維側の濃度と空気領域側の濃度は次に示す(3)式と(4)式を同時に解くことによって得られる。

$$D_f^* \frac{\partial C_{fb}^*}{\partial x^*} = D_a^* \frac{\partial C_{ab}^*}{\partial x^*} \quad (3)$$

$$C_{fb}^* = R_s C_{ab}^* \quad (4)$$

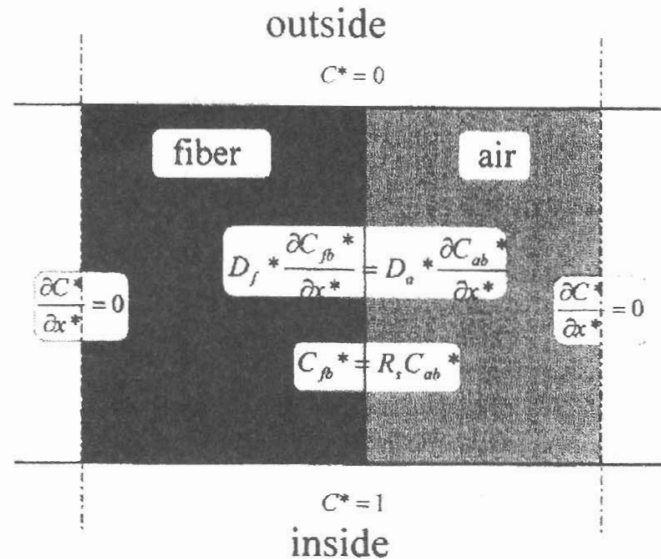


Fig. 2 Calculation area and boundary conditions for calculations.

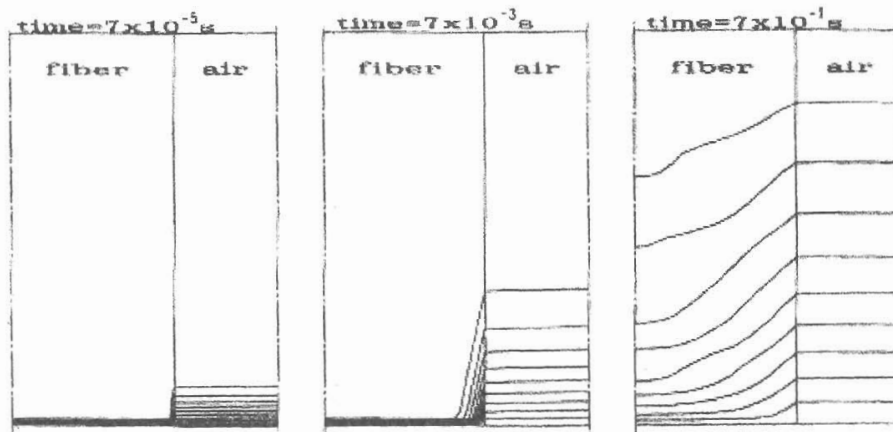


Fig. 3 Change with time of contour lines of the moisture concentration distribution.

$$(D_f^* = 10^{-3}, R_s = 10^2, W^* = 10^{-1})$$

ここで、無次元変数  $C_{ab}^*$  は繊維材料と空気の境界上での空気領域側の濃度で、 $C_{fb}^*$  繊維材料側の濃度である。ともに  $C_{ac}$  で無次元化している。 $R_s$  は空気領域の蒸気濃度にたいする繊維材料内の蒸気濃度の比。(一般に繊維材料の蒸気濃度は空気領域の蒸気濃度に比例しないが、ここでは単純化した)

## 2. 2 数値計算

本報告では空気領域の蒸気濃度にたいする繊維材料内の蒸気濃度の比  $R_s$  として  $10^2$  を用いた。布の厚さ  $z$  を 1 mm とした。差分格子の数は  $50 \times 50$  とし、計算時間を節約するために SOR 法を用いて収束を早めた。繊維材料領域と空気領域の比は

6 : 4 とした。計算の開始時 ( $t = 0$  s) ではモデルの内部の無次元蒸気濃度  $C^*$  はモデルの身体とは反対側 (外側) と同様にゼロとした。モデル内側 (身体側) では図 2 に示すように 1 とした。

## 3. 結果と考察

図 3 に蒸気濃度分布の時間経過を示す。計算条件は  $D_f^* = 10^{-3}$ 、幅に対する高さの比を 10 とした。図の等高線の間隔は空気領域では 0.1、繊維領域では  $1 \times R_s$  とした。蒸気は時間の経過とともに蒸気濃度 100% ( $C^* = 1$ ) 一方の端からゼロ濃度 ( $C^* = 0$ ) の端に繊維領域と空気領域を通り拡散している様子、および、モデルの空気領域から織



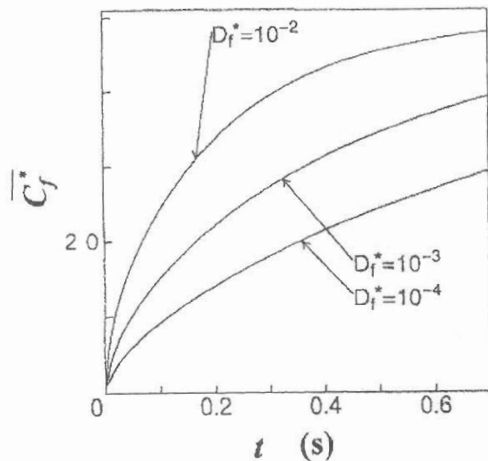


Fig. 4 Change in the mean moisture concentration in the fiber area for various fiber diffusion constants.

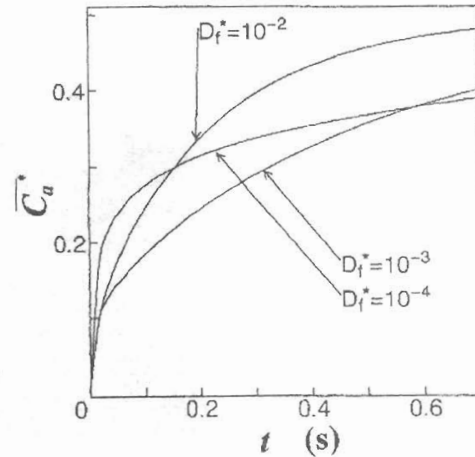


Fig. 5 Change in the mean moisture concentration in the air space for various fiber diffusion constants.

維領域へも流れていくことが観測される。

### 3. 1 繊維材料の拡散係数依存性

図4に時間経過による繊維領域の平均無次元蒸気濃度  $\bar{C}_f^*$  の変化の種々の拡散係数について示す。蒸気濃度は時間とともに増加し、繊維領域の拡散係数が大きいほど大きくなる。

図5に空気領域の平均無次元蒸気濃度  $\bar{C}_a^*$  の時間経過による変化を示す。時間経過に対する濃度変化曲線の傾きは、透湿開始初期には繊維材料内の拡散係数が小さいほど大きい。時間が経過するにつれてその傾向は逆になり、その曲線は交わるようになる。

図6に繊維領域と空気領域の境界を蒸気が通過する平均無次元速度  $\bar{V}_b^*$  の変化を示す。

$$\bar{V}_b^* = D_f^* \frac{\partial C_f^*}{\partial x^*} \Big|_{x^*=boundary} = D_a^* \frac{\partial C_a^*}{\partial x^*} \Big|_{x^*=boundary}$$

通過速度  $\bar{V}_b^*$  は透湿開始初期には拡散係数が大きいほど速いが、時間の経過とともに逆になる傾向を示し、さらに経過すると完全に逆になる。通過速度の最大点は繊維材料の拡散係数の大きいほど大きくなる傾向を示した。

### 3. 2 モデル幅依存性

繊維材料の拡散係数  $D_f^* = 10^{-2}$  について、繊維及び空気の両領域での平均蒸気濃度  $\bar{C}_{total}^*$  の時間変化を種々のモデル幅について計算した結果を図7に示す。

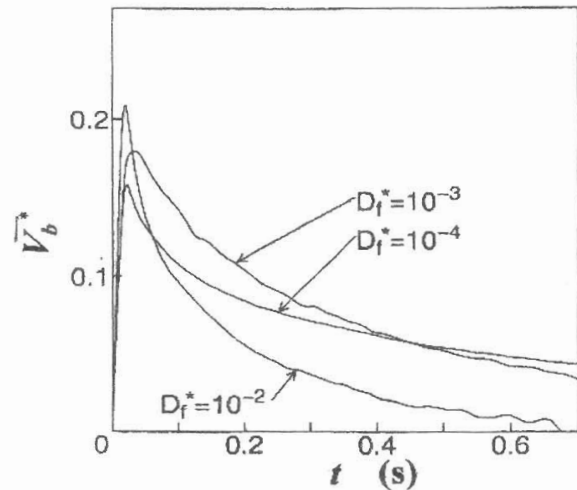


Fig. 6 Change in mean absorption rate of moisture across the boundary of air space and fiber areas for various fiber diffusion constants.

平均蒸気濃度はモデルの幅が狭い場合、例えば  $W^* = 10^{-2}$  では透湿開始初期には広い場合に比べて早く大きくなる。この増加率は時間経過とともに急激に低下する。ここでの最も広いモデル幅  $W^* = 1$  の場合、初期の増加率は最も低い、時間経過に対する増加率は狭いモデルに比べてそれほど急激ではない。それ故、それらの曲線は拡散係数の異なる場合の空気領域での蒸気濃度変化と同様、時間が経過するにつれてお互い交わるようになる。

これらの複雑な現象を説明するために、図8に平衡蒸気濃度に対する一定割合の濃度に達するまでの時間のモデル幅依存性を示す。平衡蒸気濃度



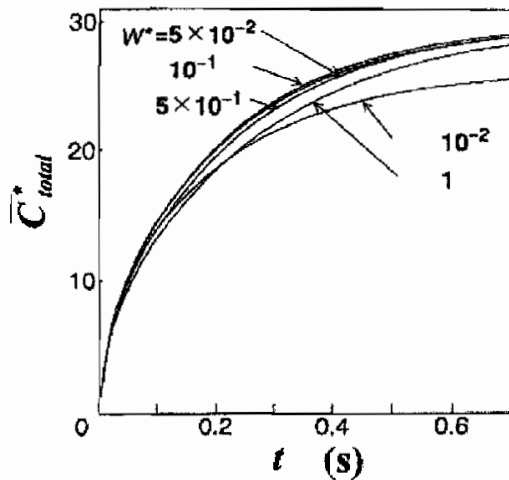


Fig. 7 Change in the total moisture concentration for various model widths

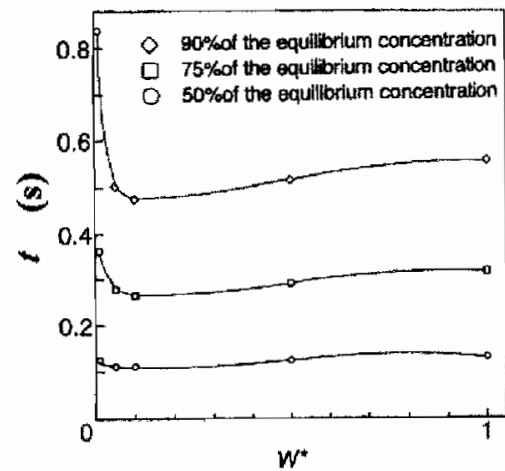


Fig. 8 Relation between the model width and the time to attain a certain level of the moisture concentration.

とはモデル中で到達できる最大の濃度で、平衡蒸気濃度に到達によって蒸気の移動は定常になる。

モデル幅が0.1以下程度では、モデル幅が狭いほうが、一定割合の濃度に達するまでの時間は長くなる。しかし、モデル幅がより広い場合にはモデル幅が広くなるに連れて逆に到達時間は大きくなる。この理由は図9により説明できる。図9は繊維領域と空気領域の境界を通過する蒸気の平均移動速度の時間変化を示している。通過蒸気の移動速度はモデル幅の小さいほど遅くなる。これは、モデル幅が小さい場合には空気領域の入り口が小さいため入り口から流入する蒸気が少なく、そのため繊維領域と空気領域の境界を通過して繊維領域に流入する蒸気量が少ないからである。このことから、蒸気濃度が一定に達する時間は幅の狭いモデルほど長くなるのである。

#### 4. まとめ

本報告は、繊維材料の拡散係数を考慮しつつ、繊維領域の空気領域に対する比率による、蒸気移動の過渡現象としての複雑な現象を解析したものである。これらの現象は実験的には他の研究者によってすでに報告されている。

具体的には、繊維集合体を2次元にモデル化して、その中を流れる蒸気濃度変化の時間依存性を数値シミュレーションした。繊維材料領域と空気領域中の蒸気移動を、拡散方程式を用いて数値計

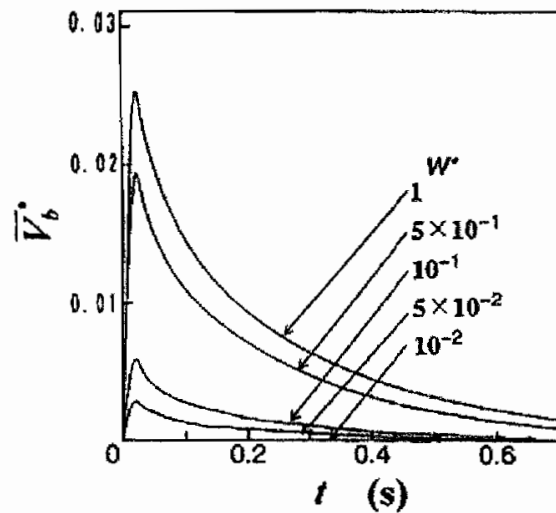


Fig. 9 Change in the mean absorption rate of moisture across the boundary for various model widths.

算し次のような結果を得た。

空気領域の蒸気濃度は繊維材料中での蒸気の拡散係数に依存する。また、その時間依存曲線は繊維材料中の拡散係数の小さい場合が大きい場合より透湿開始初期には急で、時間が経過するにつれてその傾向が逆になり、結果として拡散係数の異なった曲線は交差するようになる。

繊維領域と空気領域の境界を通過する蒸気の手速度は、透湿開始初期には繊維の拡散係数の大きいほうが大きい。しかし、時間経過とともにこの傾向は逆になる。透過速度のピークの値は拡散係数の大きい順に大きくなっている。

蒸気濃度が平衡値に達するまでの時間は、狭い

幅のモデルについては空気領域の入り口が小さいということから長くなる。モデル幅が広くなるにつれてその時間は短くなり素早く平衡に達するようになる。しかし、さらに広くなると再びその時間は繊維領域が大きくなるという理由で長くなる。

## 引用文献

- [1] Fukuda M., Torii T. and Niihira S., Development of Simulation System for Selecting and Optimizing the Function of Lining Textile., *Descente Sports Science*, 19, 131 (1998)
- [2] Kanctuna H., Kohbe T., Taknaka T., and Makabe A., Mechanism of Moisture Permeation through Cellulose Fabrics, *Sen-i Gakkai-shi*, 52, No.5, 224 (1996)
- [3] Kim J.O. and Spivak S.M., Dinamic Moisture Vapor Transfer through Textile, Part II: Further Techniques for Microclimate Moisture and Temperature., *Textile Res. J.*, 64(2), 112 (1994)
- [4] Niwa H., Studies of Peameability of Clothing Materials to Vapor, Part I: Effect of Clothing Materials for Initial Permeation Process, *Kaseigaku Kenkyu*, 8, 113 (1961)
- [5] Wehner J.A., Miller B., and Rebenfeld L., Dinamics of Water Vapor Transmission through Fabric Barriers., *Textile Res. J.*, 58, 581 (1988)

# 実習用簡易繰糸器の開発

一田昌利\*・小林崇子\*\*・黒田豊子\*\*

## Development of the Reeling Machine for Practice

Masatoshi ICHIDA\*, Takako KOBAYASHI\*\* and Toyoko KURODA\*\*

\*Center for Bioresource Field Science, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology,  
Saga-ippongi-cho Ukyo-ku, Kyoto, 616-8354, Japan

\*\*Kyoto Kagaku Co.LTD., Shimotobawatarase-cyo 35-1 Fushimi-ku, Kyoto, 612-8393, Japan

### 1. はじめに

近年、総合学習の教材としてカイコの飼育に取り組む小・中学校が増加している。特に京都は絹とのかかわりが深く、著者らもこれらの授業にかかわりを持つことが多くなってきた。カイコの飼育自身は蚕種と桑が供給できれば、授業が成立し、成果も得られる。しかしながら、得られた繭を使用して授業内容を発展させようとした場合に、繭を生糸に繰糸できず、困っている状況を見かける。

一方、著者の研究室ではカイコ品種によって繭層タンパク質、特にセリシン部の構成に違いを認め [1]、繭層タンパク質の違いが生糸の性状に及ぼす影響を解明したいと考えていたが、少量の繭から目的織度の生糸を繰糸する簡易な装置がなく、研究の進展に困難をきたしていた。これまでは、少量の繭から生糸を繰糸する方法として、手繰り器が利用されてきたが、手繰り器の入手が難しく、たとえ入手できたとしても検尺機能がなく、定粒繰糸となるため、織度を明確に表示できなかった。また、検尺器についても図1のタイプが利用されてきたが、現存数が少なく、新しく作ろうとすると1台30万円近くする。また、検尺器で繰り取った糸を揚げ返すことが困難で、生糸としての利用に制限があった。これでは先に述べた総合学習への導入や研究のための機材として利用することには問題がある。そこで今回、検尺機能を併せ持つ

た簡易型繰糸器の開発を行った。

### 2. 試作および構造

従来の検尺器の内部は、図2、3に示したように木製の歯車と板バネで構成され、きわめて複雑な構造であった。また、糸枠が200回転するたびに停止装置が働き、繰り取り作業が中断するため、作業が煩雑であった。今回の簡易型繰糸器の開発に当たっては構造の簡素化と既にある他の機器の部品を組み合わせることで回転数を表示し、途中での停止がないことを前提として作成した。

その結果、図4の試作器が完成した。下の大きな回転盤を回転させるとベルトでつながれた上部の回転盤が回転する。上部の回転盤の回転軸は糸枠を固定できるようになっており、上部と下部の回転盤の比は1:3.5に設定してある。図5は下部回転盤の力を絡交部に伝える駆動連結部である。垂直に交わる2つの歯車で構成されている。回転軸の動きを垂直に変換し、反対側にある絡交棒を駆動させるためのカムを動かしている(図6、7参照)。絡交棒上部は糸枠の幅より少し小さい間隔を左右に振りながら糸枠に繰り取った生糸を交絡させながら巻きつける働きをサポートしている。図8は糸枠の回転数表示部である。回転数は図9の回転軸に埋め込まれた円形の金属片が軸の上端に来るとカウントする仕掛けとなっている。概ね

\*連絡先: 京都工芸繊維大学繊維学部附属生物資源フィールド科学教育研究センター、  
616-8354 京都市右京区嵯峨一本木町1、TEL 075-861-0741、FAX 075-881-8418



図1 従来の検尺器

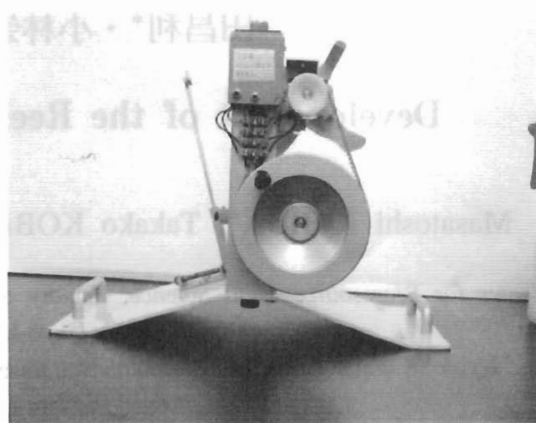


図4 新しい簡易型繰糸器

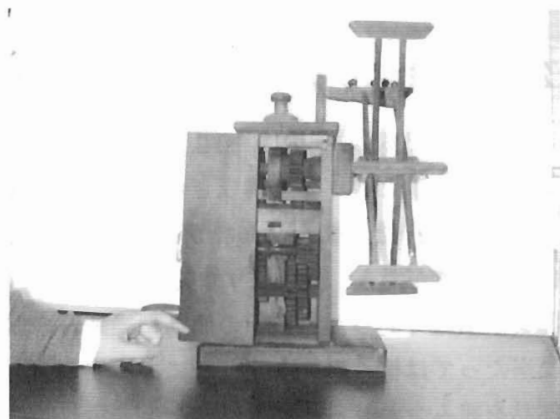


図2 検尺器の内部

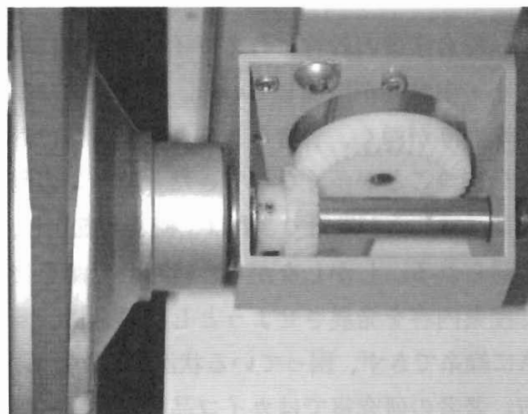


図5 駆動連結部

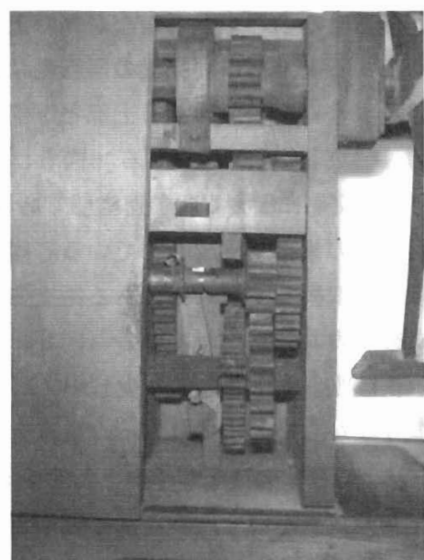


図3 検尺器内部

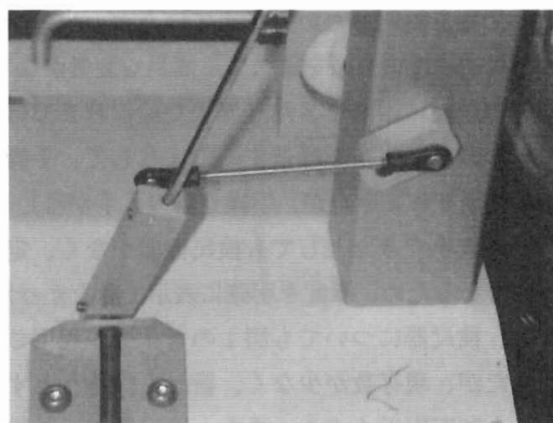


図6 絡交部カム (右へ移動)

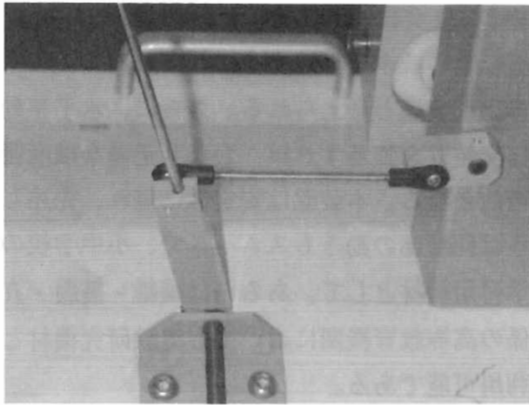


図7 絡交部カム (左へ移動)

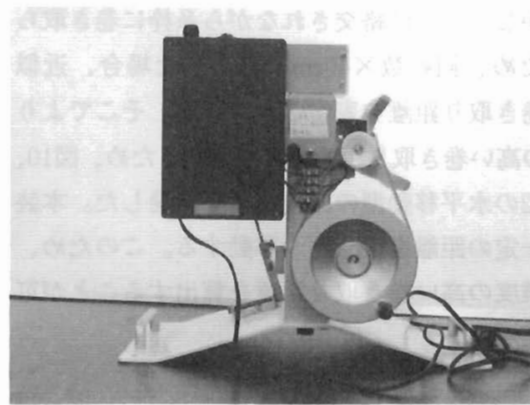


図10 水平移動型絡交装置



図8 回転表示部

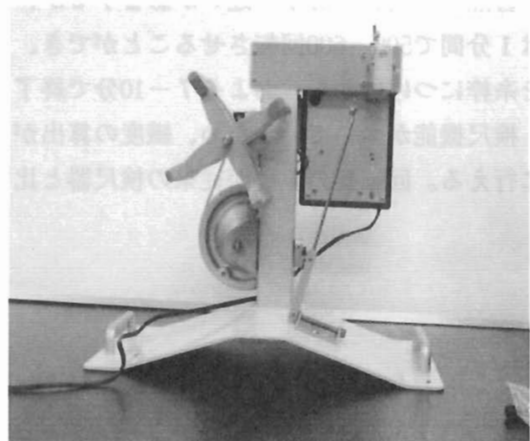


図11 水平移動型絡交装置

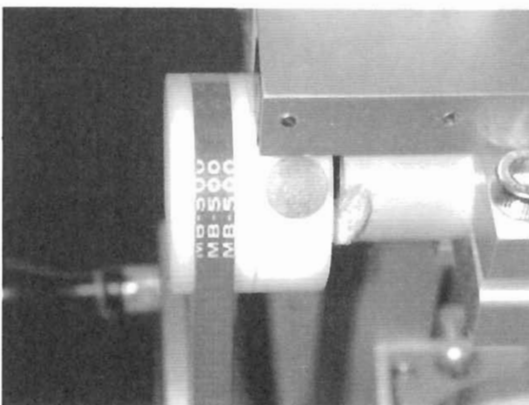


図9 回転数カウント用金属

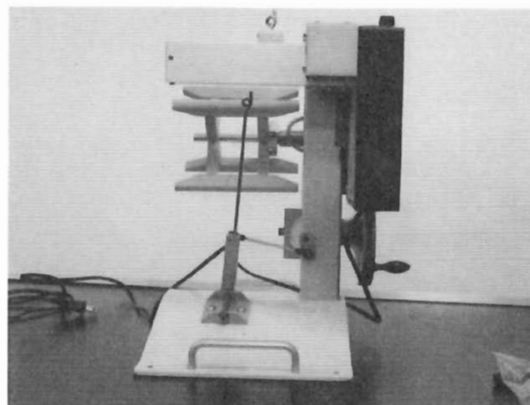


図12 水平移動型絡交装置

糸枠1回転すると40cmの糸が巻き取られたこととなる。

しかし、生糸は絡交されながら糸枠に巻き取られるため、回転数×40cmで算出した場合、近似的な巻き取り距離を表すことになる。そこでより精度の高い巻き取り距離を算出させるため、図10、11、12の水平移動型の絡交装置を開発した。本装置は一定の距離を少しずつ移動する。このため、より精度の高い巻き取り距離を算出することが可能となった。

### 3. 機能

1200m程度の繭糸長を持つ繭1個の繰り取り時間は、習熟の程度、解舒率の違いが影響するが、糸枠は1分間で500-600回転させることができ、緒糸を糸枠につけてから、およそ7-10分で終了する。検尺機能がついているため、織度の算出が容易に行える。回転盤の駆動が従来の検尺器と比

較してきわめてスムーズであり、途中でのリセットも必要ないことから、巻き取り時間が大幅に短縮すると共に、小学生以上ならば簡単に操作でき、回転数の読み取りもすぐに行えるため、取り扱い容易な装置と考えられる。さらに、水平移動型の絡交装置を装着すれば、かなり正確な織度測定が可能となる。本装置は安定性に優れ、先述したように回転部の動きもスムーズで、小中学校の総合学習用機材として、あるいは繊維・被服・衣料関係の高等教育機関においても実験研究機材として利用可能である。

### 引用文献

- [1] 三浦芳子 (2000) : The Research on the Interspecies Variation of the Cocoon Shellproteins, pp.1-96, 京都工芸繊維大学工芸化学研究科修士論文.

# セリシン部タンパク質のカイコ品種間差異に関する 研究 I

一田昌利\*・三浦芳子\*・亀井加恵子\*・原 三郎\*・山崎 隆\*\*

## The Difference in the Content of Sericin Protein among the Silkworm Strains and Varieties I

Masatoshi ICHIDA\*, Yoshiko MIURA\*, Kaeko KAMEI\*, Saburo HARA\*  
and Takashi YAMAZAKI\*\*

\*Center for Bioresource Field Science, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology,  
Saga-ippongi-cho, Ukyo-ku Kyoto, 616-8354, Japan

\*\*Kinugasa Textile Research Institute, The Kinugasa-kai Foundation, 29 Kitano Shimo-hakubai-cho,  
Kita-ku, Kyoto, 603-8326, Japan

### 1. はじめに

家蚕糸は、天然繊維の中では細繊維長繊維（フィラメント繊維）に属する繊維であり、主要成分の繊維状タンパク質であるフィブロインと水溶性タンパク質のセリシンから構成されている[1]。その家蚕糸の主成分の1つであるセリシンは、繭層中に約25-30%含まれ[1-2]、一般的には精練により取り除かれる[2]。

近年、絹製造工程において精練により廃棄されてきたセリシンは生体適合性に優れ、抗酸化作用や抗腫瘍効果などの新しい機能の認められることが判明し、繊維加工剤、食品素材、化粧品素材、サニタリー素材など様々な分野への応用が試みられ、天然物由来の有機素材としての利用拡大が期待されている。

最近の報告では、絹糸の主成分であるセリシンとフィブロイン以外に、繭層中のタンパク質としてP25 (25kDa, 29kDa, 30kDa) [3-6]、トリプシンインヒビター (6 kDa) [7]、トレハララーゼ[8]、シュークララーゼ (70Kda) [9-10]、未知の低分子タンパク質[11-13]などの存在が確認され、その多

くはセリシン部分に存在していた。

一方、著者らは、日本種と熱帯種のカイコを交配させ、得られた黄繭を繰糸し、本来は精練によって取り除かれるべきセリシン部を残した未精練布を製織した。黄色繭糸には抗菌性や静菌性があるという報告[14]があり、製品とした場合に付加価値が高まるものと考えられる。さらに、本試作品は天然素材ならではの独特の光沢、肌触りのある織物に仕上がった。カイコにおけるフィブロインタンパク質には品種間差異が少ないことから、独特の光沢、肌触りは繭層中のセリシンタンパクがカイコ品種によって異なることに由来し、製品となった場合に異なる光沢、触感などを得られるのではないかと推察した。そこで本研究では、カイコ品種・系統間におけるセリシンタンパク質の差異を調査するとともに、セリシン部に存在する様々なタンパク質を同定することを目的とし、最初の取り組みとして繭層からセリシン抽出を行った場合のセリシン回収率を比較検討した。

\*連絡先：京都工芸繊維大学繊維学部附属生物資源フィールド科学教育研究センター、  
616-8354 京都市右京区嵯峨 一本木町1、TEL 075-861-0741、FAX 075-881-8418



## 2. 材料および方法

### 2. 1 供試品種・系統

供試品種・系統は、当センターで継代している品種、中国安徽省農業大学 附属蚕場および農林水産省蚕糸昆虫農業技術研究所から分譲を受けた原種カイコである日本種15品種19系統、日中固定種2品種、中国種22品種23系統、欧州種3品種、熱帯種1品種の繭、および九州大学から分与を受けた遺伝子突然変異10系統、祖先種2系統の桑葉飼育したカイコ諸系統品種の繭の他に、全齢人工飼料飼育を行った日本種1品種、熱帯種1品種の合計46品種53系統の繭を供試した。なお、中国安徽省農業大学 附属蚕場より恵与された日本種カイコ9品種は日本種、中国種11品種は中国種として扱うとともに、名称はローマ字表記とした。また、中国クワコは九州大学 伴野 豊博士から分譲を受けた。

### 2. 2 繭層セリシタンパク質の抽出

各品種・系統から収繭した繭層の汚染部を取り除き、エッペンドルフチューブに繭層40mgをいれ、抽出緩衝液〔2% SDS、5% 2-メルカプトエタノール、8 M 尿素を含む10mM Tris-HCl buffer (PH7.0)〕1 ml を加え、25℃ 48h抽出した。次いで、遠心分離 (18,000rpm 4℃ 20min.) によって可溶部と沈殿部(繊維状)に分離し、本実験においては可溶部を抽出セリシン分画とした(図-1)。また、繭層タンパク質の回収率を算出するため、抽出残渣(繊維状)に付着している抽出緩衝液をイオン交換水で良く洗浄した後、凍結乾燥(EYELA FREEZEDRYER FDU-830)し、抽出前の繭層重量から繭層タンパク質の回収率を以下の式により算出した。

[回収率算出式]

$$100 - \frac{\text{抽出前の繭層重量}}{\text{抽出後の乾燥繭層重量}} \times 100$$

(単位 %) )

回収率は二標本t検定によって検定した。

### 2. 3 SDS-PAGEによるセリシンの確認

SDS-PAGEはLaemmli (1970) の方法に準じ行っ

た[15]。14%ポリアクリルアミド(6×9 cm)を使用し、12mAで電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルを固定し、クイックCBB(和光純薬工業株式会社製)にて染色した。

分子量マーカーとしてBovine Albumin (M.W. 66,000)、Egg Albumin (M.W.45,000)、Carbonic anhydrase (M.W.29,000)、Lysozyme (M.W.14,300)を使用した。

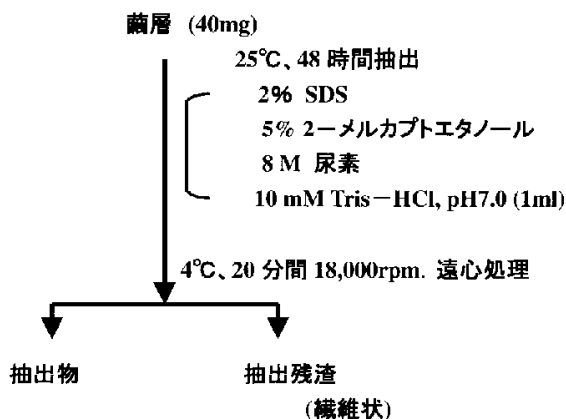


図1 繭層タンパクの抽出方法

## 3. 結果及び考察

### 3. 1 繭層セリシタンパク質の抽出について

本実験では、繭層40mgに抽出緩衝液〔2% SDS、5% 2-メルカプトエタノール、8 M 尿素を含む10mM Tris-HCl buffer (PH7.0)〕1 ml を加え、25℃ 48hを行ったが、繭層の可溶性画分にフィブリン(H鎖350kDa、L鎖25kDa)の可溶浸出の懸念を考慮し、苛性ソーダによって完全にセリシンを取り除いたフィブリンと2.2によって得られた可溶性画分をSDS-PAGEにより比較した。その結果図-2に示したように用いた材料間では安定したパターンを示し、懸念されたフィブリン可溶性現象は、本実験で用いた抽出条件下においては起こっていないことが推測された。効率的にセリシンを抽出する方法として100℃、尿素溶液による抽出方法も報告されているが、本実験で用いた方法は比較的温和な条件でのセリシン抽出であり、問題を提起する方法とは考え難い。

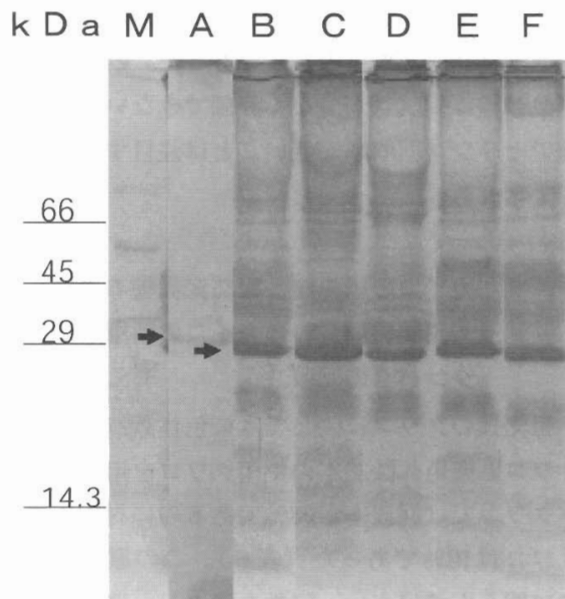


図2 フィブロインと可溶性画分のSDS-PAGE

M; マーカー

A; フィブロイン B; 大造 (長野)

C; 大造 (松村) D; 青熟 (羽生田)

E; 湖北 F; 雪花

表1 日本種における繭層セリシタンパクの回収率

品種名	抽出後の残渣量 (mg)	回収率 (%)
青熟	30	25
青熟 (羽生田)	30	25
赤熟	30	25
金色 (前橋)	31	23
小石丸 (亘理)	28	30
小石丸 (滋賀)	29	28
小石丸 (KIT)	29	28
小石丸 (宮崎)	29	28
青白 (山形)	30	25
琉球多蚕繭	32	20
110	30	25
112	31	23
118	33	18
401	35	13
J1	33	18
J2A	33	18
Genkai	35	13
Hougetsu	35	13
Syunso	35	13

### 3. 2 日本種の繭層セリシタンパクの回収

日本種の回収率についてみると当センターで飼育した10系統 青熟、青熟 (羽生田)、赤熟、金色 (前橋)、小石丸 (亘理)、小石丸 (滋賀)、小石丸 (KIT)、小石丸 (宮崎)、青白 (山形) 及び琉球多蚕繭の繭層セリシタンパクの回収率は20-30%の範囲にあった。ただし、日本種に加えた琉球多蚕繭については他の日本種と比較して少なく20%であった。一方、中国安徽省農業大学 附属蚕場より恵与された日本種カイコ9品種 (110、112、118、401、J1、J2A、Genkai、Hougetsu、Syunso) からの回収率は13-25%の範囲にあった (表1)。

当センターで飼育した日本種10系統の回収率と中国安徽省農業大学 附属蚕場より恵与された日本種カイコ品種9系統の二場所間のセリシタンパク回収率は明らかに差が認められた。

### 3. 3 中国種の繭層セリシタンパクの回収

中国種についてみると、当センターで飼育した12系統 漢口赫繭、黒縞、湖北、支124、支21、新竜角、雪花、大造 (長野)、大造 (松村)、大巷上、天門、輪月の繭層セリシタンパクの回収率は15-

表2 中国種における繭層セリシタンパクの回収率

品種名	抽出後の残渣量 (mg)	回収率 (%)
漢口赫繭	33	18
黒縞	34	15
湖北	30	25
支124	32	20
支21	31	23
新竜角	34	15
雪花	30	25
大造 (長野)	30	25
大造 (松村)	31	23
大巷上	31	23
天門	28	30
輪月	30	25
107	35	13
115	34	15
965	34	15
4D	35	13
C15B	35	13
C5B	31	23
Shunrai	35	13
Chinhou	35	13
Jou B	28	30
Meishu	33	18
Shoumatsu	33	18

30%の範囲にあった。これに対して中国安徽省農業大学 附属蚕場より恵与された中国種カイコ11品種のうち107、115、965、4D、C15B、Shunrei、Chinhou、Meisyu、Shoumatsuの回収率は20%以下と低く、C5Bは23%、JouBで30%を示した(表2)。

当センターで飼育した日本種12系統の回収率と中国安徽省農業大学 附属蚕場より恵与された日本種カイコ品種11系統の二場所間のセリシタンパク回収率は、日本種の場合と同様明らかに差が認められた。

これらの原因に関しては明らかではないが、当センターで飼育して得られた繭が生繭であったのに対し、中国安徽省農業大学 附属蚕場より恵与された繭は乾燥処理が施されていた可能性があることに起因していると推測された。

### 3. 4 その他欧州種、熱帯種、日中固定種の繭層セリシタンパクの回収

欧州種は供試系統数が3系統と少なかったが、表-3に示したように回収率は18-25%の範囲にあった。熱帯種もアンナン1系統のみであったが、回収率は15%(表4)であった。日中固定種に関

表3 欧州種における繭層セリシタンパクの回収率

品種名	抽出後の残渣量 (mg)	回収率 (%)
Asukori	33	18
Kokuga	30	25
Roza	30	25

表4 熱帯種における繭層セリシタンパクの回収率

品種名	抽出後の残渣量 (mg)	回収率 (%)
An-nan	34	15

表5 日中固定種における繭層セリシタンパクの回収率

品種名	抽出後の残渣量 (mg)	回収率 t (%)
Watako	33	18
Daiankyo	32	20

しては綿蚕および大安橋の2品種を供試したが、回収率は18-20%(表5)であった。欧州種および熱帯種は供試数が少なく評価できないが、熱帯種でセリシン回収率が低いことは注目すべき点と考えられる。

### 3. 5 カイコの祖先種、突然変異種および人工飼料飼育したカイコの繭層セリシタンパクの回収

祖先種のクワコに関しては染色体数27本の日本クワコと染色体数28本の中国クワコを用いた。日本クワコでは回収率が28%であるのに対して中国クワコは10%であった(表6)。この原因に関しては明らかではない、例数を増やし、確認する必要がある。

遺伝子突然変異10系統では15-53%の回収率であった(表7)。これらの内Nd系統2種の回収率が53%と非常に高い値を示したが、これはNd系統がフィブロインをほとんど合成しない裸蛹系統であることに起因している。

人工飼料飼育した2品種の回収率はAn-nanが18

表6 カイコ祖先種における繭層セリシタンパクの回収率

系統名	抽出後の残渣量 (mg)	回収率 (%)
<i>Bombyx mandarina</i> (Japan)	29	28
<i>Bombyx mandarina</i> (Chaina)	36	10

表7 突然変異系統における繭層セリシタンパクの回収率

系統名	抽出後の残渣量 (mg)	回収率 (%)
Ndb41	19	53
NdHb40	19	53
P22P3	33	18
P3×P3 otm Pere	28	30
b84	33	18
d90	31	23
l23	34	15
l31	29	28
C15	31	23
C04	31	23

表8 人工飼料飼育したカイコにおける繭層セリシタンパクの回収率

品種名	抽出後の残渣量 (mg)	回収率 (%)
An-nan	33	18
金色 (前橋)	30	25

%, 金色(前橋)が25%となった(表8)。人工飼料飼育した2品種の繭層セリシタンパクの回収率が桑葉飼育したものと比較して有意な差は認められないものの、高くなる傾向にあった。

以上の結果のように、日本種と中国種では繭生産場所の違いによって繭層セリシタンパクの回収率に差が認められたが、この原因は先述したように収繭後の繭の加熱乾燥処理が関与したのではないかと考えられた。

一方、供試蚕品種数の多い日本種と中国種間では、当センターで飼育して得られた繭に関しては中国種の回収率が僅かに低い傾向が覗われたが、日本種と中国種間には繭層セリシタンパクの回収率に差は認められなかった。

今後、セリシタンパク抽出液の分析を行う予定である。

## 引用文献

- [1] シルクサイエンス研究会, 1994. シルクの科学 (シルクサイエンス研究会編), 31, 86-87, 朝倉書店, 東京.
- [2] 皆川 基, 1981. 絹の科学, 58, 38-39, 関西衣生活研究会, 大阪.
- [3] Zurovec, M., Vaskova, M., Kodrik, D., Sehnal, F., and Kumaran, A.K. 1995. Light-chain fibroin of *Galleria B. mellonella*. *Mol. Gen. Genet.*, 247, 1-6.
- [4] Zurovec, M., Yang, C., Kodrik, D., and Sehnal, F. 1998. Identification of a novel type of silk protein and regulation of Its Expression. *J. Biol. Chem.*, 273, 25, 15423-15428.
- [5] Zurovec, M., Kodrik, D., Yang, C., Sehnal, F., and Scheller, K. 1998: The P25 component of *Galleria* silk. *Mol Gen Genet.*, 257, 264-270.
- [6] Yang, C., Teng, X., Zurovec, M., Scheller, K., and Sehnal, F. 1998. Characterization of P25 silk gene and associated insertion elements in *Galleria mellonella*. *Gene.*, 209, 157-166.
- [7] Kurioka, A., Yamazaki, M. and Hirano, H. 1999. Primary structure and possible functions of a trypsin inhibitor of *Bombyx mori*. *Eur. J. Biochem.*, 259, 120-126.
- [8] Shimada, S., Kamada, A., and Asano, S. 1980. The cocoon trehalase of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, 10, 49-52.
- [9] Shimada, S., and Hayashiya, K. 1975. Isolation of a protein with saccharase activity from the liquid silk of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, 5, 357-369.
- [10] 古澤 壽治, 杉村 順夫, 竹 明美, 一田 昌利, 小谷 英治, 坂部 寛, 渡邊 隆夫, 今溝 真理, 東端 晃, 中野 完, 長岡 敏治, 1999. カイコ繭糸の性状に及ぼす重力変化の影響. 合同研究発表会公演要旨集, 日本蚕糸学会関西支部 関西蚕桑技術連絡会, 65, 28.
- [11] 栗岡 聡, 平野 久, 1996: 家蚕繭層低分子量タンパク質のトリシン電気泳動法による分析. 日蚕雑, 65, 125-127.
- [12] 栗岡 聡, 平野 久, 小松 一計, 1994. 繭層11 kDaタンパク質の精製とN末端一次構造分析. 日蚕雑, 63, 72-78.
- [13] 栗岡 聡 1994: 繭層低分子量タンパク質のN末端アミノ酸配列分析. 蚕研彙報, 42, 19-25.
- [14] 全国養蚕農業協同組合連合会, 1998. 蚕糸の光, 51, 26-29, 全国養蚕農業協同組合連合会, 東京.

## 財団法人 衣笠会繊維研究所活動状況

### 1. 平成16年度各種学会口答発表 (下線は財団理事及び評議員)

- 1) 八並 寿・福田栄一・一田昌利・小野寺敏：各種桑品種の1-DNJ含量と $\alpha$ -グルコシダーゼ活性. 日本農芸化学会2004年次大会
- 2) 一田昌利・河木愛実：光線照射と黄色繭の繭色変化. 日本蚕糸学会第73回学術講演会, 2004
- 3) 一田昌利：タイ王国東北地域における養蚕. 日本野蚕学会第10回大会, 2004.
- 4) 藤井佳美・野田亜友美・遠藤 太・河木愛実・一田昌利：蛍光繭に関する研究Ⅰ. 日本蚕糸学会第70回関西支部・第60回九州支部合同研究発表会, 2004.
- 5) 中村照子・一田昌利・峰下 雄：蚕血液のレオロジー特性を考慮した健康食品の開発 (第2報). 第52回レオロジー討論会, 2004
- 6) 中村照子・一田昌利・峰下 雄：蚕血液のレオロジー特性を考慮した健康食品の開発 (第2報). 第27回日本バイオレオロジー学会, 2004
- 7) 加藤靖夫・武内民男：カイコ体液中のガラクトシダーゼの検索について. 日本蚕糸学会第60回九州支部・第70回関西支部合同研究発表会, 福岡, 2004
- 8) 小谷英治・武藤清佳・斎藤 準：カイコRNA結合蛋白質人為抑制による細胞内転写産物量変化. 日本蚕糸学会関西支部・九州支部合同研究発表会, 京都市, 2003
- 9) 黄 俊逸・定金恵子・有松祐治・遠藤泰久・古澤壽治 (2004)：家蚕卵でのトレハラーゼ活性上昇と遺伝子の発現；日本蚕糸学会第74回学術講演会要旨集, p.67, 盛岡
- 10) 有松祐治・小谷英治・杉村順夫・宮田清司・古澤壽治 (2004)：カイコ消化液ヌクレアーゼのプロセッシングについて. 日本蚕糸学会第74回学術講演会2002講演要旨集, p.49, 盛岡
- 11) 定金恵子・黄 俊逸・遠藤泰久・古澤壽治 (2004)：カイコ絹糸腺におけるトレハラーゼ活性の変動とmRNAの発現. 日本蚕糸学会第74回学術講演会要旨集, p.59, 盛岡
- 12) 有松祐治・小谷英治・杉村順夫・古澤壽治 (2004)：カイコ消化液ヌクレアーゼのプロセッシングについて (第3報). 日本蚕糸学会第60回九州支部・第70回関西支部合同研究発表会発表講演集, p.29, 福岡
- 13) 定金恵子・長岡純治・黄 俊逸・遠藤泰久・古澤壽治 (2004)：蚕の絹糸腺における5齢期の炭水化物代謝について—特にトレハラーゼとソルビトール-6-リン酸脱水酵素の活性変動—. 日本蚕糸学会第60回九州支部・第70回関西支部合同研究発表会発表講演集, p.30, 福岡
- 14) Yukimatsu, K., Shimabukuro, J., Nakagawa, R., Sakabe, H., Butiman, C., De-Eknamkul and Furusawa, T. (2004)：Properties of silk of a tropical race, Nang-Lai, in Thailand. International Workshop on Wild Silkmooths and Silks. Abstracts, 40-41, Thailand (Kohn Kaehn).
- 15) 古澤壽治・小谷英治・鈴木英子・有松祐治・野島久美恵・長岡俊治 (2004)：カイコの胚における放射線感受性 (シンポジウム「宇宙放射線の生物影響研究の意義」) 日本宇宙生物科学会第18回大会, p.31, 名古屋
- 16) 島袋順一・中川里紗・行松啓子・坂部 寛・古澤壽治 (2004)：人工飼料育した熱帯性蚕 (Nang-Lai) の糸質について. 日本蚕糸学会第60回九州支部・第70回関西支部合同研究発表会発表講演集, p.33, 福岡
- 17) T. MAEKAWA, S. MITSUZAWA：Relation between Air Permeability, Porosity Rate and Pick up Rate of Starched Fabric. The 20th World Congress of International Federation for Home Economics, Kyoto Japan (2004) Research and Practitioners' Paper Abstracts, p156.

- 18) 古山明子・西崎有利子・野津裕之・宿南知佐・開 祐司・森 肇：増殖因子の固相化：多角体固定化FGF-2によるNIH3T3細胞の増殖促進活性. 第70回日本蚕糸学会関西支部九州支部合同研究発表会, 2004
- 19) 山本真史・森山悠子・山尾真史・西山啓史・森 肇・田中博光・山川 稔：AcNPVとpiggyBacを用いた形質転換によるカイコRel遺伝子のRNAi. 第70回日本蚕糸学会関西支部九州支部合同研究発表会, 2004
- 20) 安田幸弘・青柳知亜紀・長岡純治・川井 淳・黒板敏弘・川上文清・森 肇：小麦胚芽無細胞タンパク質合成系による昆虫ウイルス多角体の作成に関する研究. 第70回日本蚕糸学会関西支部九州支部合同研究発表会, 2004
- 21) 古山明子・西崎有利子・野津裕之・宿南知佐・開 祐司・森 肇：増殖因子の固相化：多角体固定化FGF-2によるNIH3T3細胞の増殖促進活性. 第27回日本分子生物学会, 2004
- 22) 古山明子・西崎有利子・野津裕之・宿南知佐・開 祐司・森 肇：増殖因子の固相化：多角体固定化FGF-2によるNIH3T3細胞の増殖促進活性. 第42回日本生物物理学会, 2004
- 23) Hajime Mori, Keiko Ikeda, and Hiroshi Nakazawa : Protein Expression and Immobilization into Viral Polyhedra and Its Application. International Conference of Sericultural and Entomological Sciences, 韓国, 2004

## 2. 平成16年度各種学会誌投稿論文

- 1) Kato Yasuo (2004) : Two-Dimensional Electrophoresis of Galactosidase Relating to the Disappearance of *Bombyx* Lectin Activity. Journal of Tezukayama College Vol. 41, 93-99.
- 2) Kotani E.・Ohba T.・Niwa T.・Storey K. B.・Storey J. S.・Hara S.・Saito H.・Sugimura Y. and Furusawa T. (2004) : De novo gene expression and antisense inhibition in cultured cells of BmTRN-1, cloned from the midgut of the silkworm, *Bombyx mori*, which is homologous with mammalian TIA-1/R. Gene 320, 67-79
- 3) Sakano, D., Furusawa, T., Sugimura, Y., Storey, J.M. and Storey, K. B. (2004) : Metabolic shifts in carbohydrate metabolism during embryonic development of non-diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Biotech. and Sericol. 73 (1) 15-22.
- 4) Furuno, T., Arimatsu, Y., Sugimura, Y., Togoh, M., Ishihara, R., Tokizane, M., Kotani, E., Hayashi, Y. and Furusawa, T. Purification and properties of double-stranded RNA-degrading, nuclease, dsRNase, from the digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Biotch. and Sericol. (投稿中)
- 5) Huang, J., Furusawa, T., Sadakane, K. and Sugimura, Y. Purification and properties of soluble trehalase from embryonic larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Biotech. and Sericol. (投稿中)
- 6) Huang, J., Arimatsu, Y., Sadakane, K., Endo, Y. and Furusawa, T. Gene expression and localization of trehalase during embryonic development of the silkworm, *Bombyx mori*. Int. J. Wild Silkworm & Silk (投稿中)
- 7) Hosokawa Y., Matsumura S., Ikeda K., Shimo-oka A., Mori H., and Masuhara H. : Laser trapping and patterning of protein microcrystals toward highly integrated protein microarrays. J. Applied Physics 96, 2945-2948 (2004)
- 8) Yamamoto M., Yamao M., Nishiyama H., Sugihara S., Nagaoka S., Tomita M., Yoshizato K., Tamura T., and Mori H. : A new and highly efficient method for the silkworm transgenesis using *Autographa*

*californica* nucleopolyhedrovirus and *piggyBac* transposable elements. *Biotechnology and Bioengineering* 88, 849-853 (2004)

- 9) Sakurai T., Nakagawa T., Mitsuno H., Mori H., Endo Y., Tanoue S., Yasukochi Y., Touhara K., and Nishioka T.: The sex pheromone receptor in the silkworm *Bombyx mori*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 101, 16653-16658 (2004)

### 3. 平成16年度著書・特許等

- 1) 加藤清夫・他7名：生化学実験，化学同人（2004）
- 2) 前川輝彦，（社）日本家政学会編：新版 家政学事典，6-1-3 衣料用化学繊維 e. アクリル・アクリル系，p 655，朝倉書店（2004）
- 3) 森 肇，中澤 裕，池田敬子：昆虫ウイルスの多角体を用いたプロテインチップの開発（バイオチップの最新技術と応用 松永 是監修），シーエムシー出版（2004）

## 平成16年度講演活動報告

### 『演 題』 古代の蚕と絹糸

京都工織大繊維学部助教授  
本財団 評議員 一田 昌利

日時・場所 平成16年12月16日 独立行政法人文化財研究所 奈良文化財研究所  
対 象 者 保存科学研究集会会員  
講演要旨 養蚕業の蚕が績み出す絹は、数千年にわたって洋の東西を問わず人々を魅了しつづけてきた。特に、近世に入るまでの絹は貨幣であり、貴重品でもあった。そんな蚕と繭に関する話を様々な角度から進めた。

---

### 『演 題』 Some Biochemical Properties of Cyovirus on Lepidopterous Insects.

本財団 理事 林 幸之

日時・場所 平成17年2月1日 マハサラカム大学  
対 象 者 学生、教職員、蚕糸関係者  
講演要旨 野外鱗翅目昆虫の Cyovirus (細胞質多角体病ウイルス、CPV) の分離精製方法、ゲノム分析方法について紹介し、ゲノムが二本鎖 RNA である事を証明し、本ウイルスの生成工場 (Virogenic stroma) において RNA の合成ならびにウイルス粒子を形成する過程について報告、説明した。なお、ウイルス RNA の合成については核も少なからず関与している事を指摘した。

---

### 『演 題』 Biological Science in Space

京都工織大繊維学部教授  
本財団 理事 古澤 壽治

日時・場所 平成17年2月1日 マハサラカム大学  
対 象 者 学生・教職員・蚕糸関係者  
講演要旨 カイコの胚発生、および胚発生期における放射線感受性を理解させるために、カイコを用いた宇宙生物学実験の結果を紹介した。すなわち、カイコの卵をスペースシャトルに搭載し、1997年にケネディー宇宙センターよりカイコの卵を宇宙空間に9日間滞在させた結果と、現在建設中の国際宇宙ステーション利用生物学実験に関する地上予備実験の結果について紹介した。



【演題】 Introduction of Kyoto Institute of Technology, and Sericulture Science in Japan

京都工織大繊維学部教授  
本財団 理事 古澤壽治

日時・場所 平成17年3月1日 マハサラカム大学  
対象者 学生・教職員  
講演要旨 マハサラカム大学と京都工芸繊維大学との学術交流、ならびに学生交流がマハサラカム大学で2月27日から3月6日までの間実施した。そのなかで、京都工芸繊維大学の紹介、繊維学部の歴史のなかで蚕糸科学に関して4つの大きな学術的業績がなされ、それらが他の科学分野ならびに昆虫工学の発展に貢献していることを中心に講演した。

【演題】 タイ東北部の蚕糸業と Nang-Lai の繭糸特性

京都工織大繊維学部教授  
本財団 理事 古澤壽治

日時・場所 平成17年3月23日 京都工芸繊維大学「丹後塾」  
対象者 一般市民  
講演要旨 タイ王国・東北部の蚕糸業の現状と、この地域で飼育されているNang-Lai繭糸の特性、京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センターで桑、人工飼料で飼育したNang-Laiの繭糸特性や、これを用いて織った織物を展示した。

発行所

財団法人 衣笠会 纖維研究所  
〒603-8326  
京都市北区北野下白梅町29  
TEL 075-461-5949  
TEL/FAX 075-463-6679  
E-mail zai-kinugasakai@nifty.com  
http://www.soc.nii.ac.jp/kinugasa/

会長

林 幸之

印刷所

為国印刷株式会社  
〒604-8457  
京都府京都市中京区西ノ京馬代町6-16  
TEL 075-462-7889  
FAX 075-464-3923